

N-bundet glykosylering: Betydning for sekresjon og autoaktivering av legumain i humane celler

Roya Kasem



Mastergradsoppgave i farmasi

Seksjon for farmasøytisk biovitenskap, Farmasøytisk institutt

Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet

UNIVERSITETET I OSLO

Vår 2015

N-bundet glykosylering: Betydning for sekresjon og autoaktivering av legumain i humane celler

Roya Kasem



Mastergradsoppgave i farmasi

Veiledere

Professor Harald Thidemann Johansen

Professor Rigmor Solberg

Post doc Mads Haugland Haugen

© Roya Kasem

2015

N-bundet glykosylering: Betydning for sekresjon og autoaktivering av legumain i humane celler

Roya Kasem

<http://www.duo.uio.no>

Reprosentralen, Universitetet i Oslo

Forord

Denne oppgaven ble utført ved seksjon for farmasøytisk biovitenskap ved Farmasøytisk institutt i samarbeid med Tumorbiologisk avdeling, Radiumhospitalet, Oslo universitetssykehus. Mine interne veiledere under masterperioden er professor Harald Thidemann Johansen og professor Rigmor Solberg, og ekstern veileder Post doc Mads Haugland Haugen.

Først av alt vil jeg rette en kjempestor takk til professor Harald Thidemann Johansen for god veiledning, oppfølging og rådgivning gjennom hele masteroppgaven. Jeg vil også rette en stor takk til professor Rigmor Solberg, som for fortiden er i USA for stor hjelp og oppfølging. I tillegg vil jeg takke postdoc Mads Haugland Haugen for den gode rådgivningen og de gode innspillene gjennom hele masteroppgaven. Tusen takk til stipendiat Ngoc Nguyen Lunde for gode innspill og for din tilgjengelighet underveis. Jeg vil også rette en stor takk til overingeniør Hilde Nilsen for den gode opplæringen i det praktiske laboratoriearbeidet jeg har fått, og ikke minst alle de hyggelige samtalene.

Jeg vil også takke alle medstudenter, og alle i 4.etasje for et hyggelig miljø. En stor takk til alle mine venner for å være der hele tiden og støtte meg. Jeg vil også spesielt takk Beate Mohebi for sin oppmuntring, og troen på meg.

Takk til mamma og pappa som alltid har hatt troen på meg, og som har støttet meg gjennom alle disse fem årene og tålt stressingen og klagingen min. Tusen takk til min gode søster, Mayes Kasem som alltid har vært der når jeg har trengt henne. Tusen takk for din forståelse, støtte og oppmuntring i alle disse fem årene.

Roya Kasem

Oslo, mai 2015

Sammendrag

Legumain er en asparaginyll endopeptidase som generelt er uttrykt i de fleste normale humane vev. Studier har imidlertid vist at proteinuttrykket av legumain er oppregulert i flere faste svulster. Høyt uttrykk av legumain har blitt assosiert med cellemigrasjon og invasjon, og påfølgende dårlig prognose. Årsaken til kreftcellers spredning er fortsatt ikke kjent, men proteaser har blitt antatt å delta i denne prosessen. Proteaser kan derfor være lovende å utnytte i kreftterapi, men manglende kunnskap har ført til svikt i kliniske studier. Foreløpig, er det mange ukjente aspekter ved den subcellulære lokaliseringen, den cellulære transporten og aktiveringen av legumain. I to nylig publiserte studier i forskningsgruppen vår er det funnet at glykosylering av legumain er viktig for legumainprosessering, og at glukosaminoglykaner (GAGs) akselererer autoaktiveringen av normalprodusert (glykosylert) og sekret pro-legumain. Disse observasjonene ble studert videre i denne oppgaven.

I denne studien ble betydningen av N-koblet glykosylering av legumain undersøkt med hensyn på aktivitet, sekresjon og proteinuttrykk av legumain. To ulike celletyper ble utnyttet i studien, en monoklonal legumaintransfektet HEK293-cellelinje (M38L) og en tykk-/endetarmskreftcellelinje (HCT116). N-koblet glykosylering av legumain ble hemmet ved behandling av cellene med tunikamycin, som er et effektivt verktøy i biokjemiske studier. Autoaktivering av henholdsvis glykosylert og uglykosylert prolegumain ble undersøkt ved surgjøring av kondisjonerte medier og cellelysater fra nøytral pH til pH 4.0. I tillegg ble effekten av GAGs (kondroitin-4-sulfat (C4S) og heparansulfat (HS)) undersøkt på autoaktivering av glykosylert og uglykosylert sekret prolegumain.

Resultatene viste at prosessering av legumain til moden, uglykosylert, aktiv form (28 kDa) var totalt fraværende etter tunikamycinbehandling av HCT116-celler, mens formen ble observert i tunikamycinbehandlede M38L-celler. Videre ble det i lysater observert reduksjon i totalproteinkonsentrasjon og legumainaktivitet etter behandling med tunikamycin. Lav konsentrasjon (0,025 µg/ml) av tunikamycin økte signifikant sekresjonen av prolegumain, mens høye konsentrasjoner (1 og 5 µg/ml) hadde tendens til å redusere sekresjonen.

Selv om ulike GAGs tidligere er vist å akselerere autoaktivering av glykosylert prolegumain, så viste denne studien at C4S og HS ikke akselererte autoaktivering av uglykosylert prolegumain på samme måte. Det antas derfor at oligosakkarid-gruppene på prolegumain spiller en viktig rolle i interaksjonen med GAGs. Av de to GAGs som ble benyttet i denne studien (C4S og HS) så var det kun C4S som akselererte autoaktivering av prolegumain. GAGs effekt på autoaktivering av prolegumain ser ut å være konsentrasjonsavhengig.

Generelt viste resultatene at normal cellulær glykosylering er viktig for aktivitet, stabilitet og sekresjon av legumain.

Abstract

Legumain is an asparaginyl endopeptidase that is normally expressed in most normal human tissues. Studies have shown that protein-expression of legumain is upregulated in several solid tumors. Overexpression of legumain has been associated with cell migration and invasiveness and gives a poor prognosis. The complete reason for why cancer cells spread and metastasize is still not known, but proteases have been proposed to participate in this process. Therefore, proteases may be promising to utilize in cancer therapy. However, the lack of knowledge has led to unsuccessful clinical trials. Currently, there are several unknown aspects of the mechanisms behind the subcellular localization, cellular transport and activation of legumain. In two recent studies in our research group it was shown that glycosylation of legumain is important for legumain processing, and that glycosaminoglycans (GAGs) are accelerating autoactivation of normally produced (glycosylated) and secreted prolegumain. These observations were further studied in this thesis.

In this study, we investigated the significance of N-linked glycosylation on activity, secretion and protein expression of legumain. We used two cell lines, the legumain-transfected HEK293 cell line (M38L) and the colorectal cancer cell line HCT116. N-linked glycosylation was inhibited by the treatment of cells with tunicamycin, which is a useful tool in biochemical studies. Autoactivation of respectively glycosylated and unglycosylated prolegumain was investigated by acidification of the conditioned media and cell lysates from neutral conditions to pH 4.0. The effect of glycosaminoglycans (Chondroitin 4-sulphate (C4S) and heparan sulphate (HS)) on the autoactivation of glycosylated and unglycosylated secreted prolegumain was also investigated.

The results have shown that the processing of legumain to mature active form of legumain was totally absent after tunicamycin treatment in HCT116-cells, but was observed in tunicamycin treated M38L-cells. Total protein concentration and activity of legumain in lysates were reduced after treatment with tunicamycin. The data presented show that low concentrations (0,025 µg/ml) of tunicamycin increased the secretion of prolegumain, in contrast to the high concentrations (1 and 5 µg/ml), which had a tendency to decrease the secretion.

Although various GAGs were previously shown to accelerate the autoactivation of glycosylated prolegumain, this study showed that C4S and HS did not accelerate autoactivation of unglycosylated prolegumain in the same fashion. It is therefore believed that the oligosaccharide groups on prolegumain play an important role in the interaction with GAGs. Of the two GAGs that were used in this study (C4S and HS), it was only C4S that accelerated autoactivation of prolegumain. It seems that the effect of GAGs on autoactivation of prolegumain is concentration dependent.

In general, the results suggest that glycosylation is important for activity, stability and secretion of legumain.

Innholdsfortegnelse

Forord

Sammendrag

Abstract

Innholdsfortegnelse

Forkortelser

1	Introduksjon.....	1
1.1	Proteaser	1
1.2	Legumain	3
1.2.1	Legumainformer og aktivering	4
1.3	Cellulær transport i forbindelse med glykolysering av	5
	proenzym	5
1.3.1	Proteinglykosylering	6
1.3.2	N-koblet proteinglykosylering	6
1.3.3	Legumain og N-koblet glykosylering	8
1.4	Tunikamycin, en hemmer av N-koblet glykosylering.....	9
1.5	Glukosaminoglykaner	10
1.5.1	GAGs effekt på autoaktivering av cysteinproteaser	11
1.6	Generelle prinsipper ved kreftutvikling	11
1.6.1	Invasjon og metastasering.....	12
1.7	Legumain og kreft.....	13
1.8	Utnyttelse av proteaser i prodrug-aktivering i.....	14
	kreftterapi.....	14
2	Mål med oppgaven.....	15
3	Materialer og metoder	16
3.1	Kjemikalier og reagenser	16
3.2	Utstyrsliste	18
3.3	Celledyrkning	19
3.3.1	HCT116-celler	19
3.3.2	M38L-celler	19
3.3.3	Tining og utsåing av celler.....	19
3.3.4	Splitting av celler	19
3.3.5	Telling av celler	20
3.3.6	Stimulering med tunikamycin.....	20
3.3.7	Høsting av HCT116 og M38L-celler	20
3.3.7.1	Høsting av kondisjonert medium.....	21
3.3.7.2	Høsting av cellelysater.....	21
3.4	Totalproteinmåling	21
3.5	Legumainaktivitetsmåling.....	22
3.6	Autoaktivering av legumain.....	23
3.6.1	Spinnprotokoll.....	23
3.7	Elektroforese og immunoblotting	23
3.8	ELISA.....	25
3.9	Statistiske analyser.....	25

4	Resultater	26
4.1	Innledende forsøk med M38L-celler	26
4.1.1	Tunikamycinbehandling førte til nedgang i legumainaktiviteten i M38L-celler	26
4.1.2	Redusert totalproteinkonsentrasjon i M38L-cellelysater etter behandling med tunikamycin	27
4.1.3	Effekt av tunikamycin på proteinuttrykket av legumain i cellelysater og kondisjonerte medier	28
4.1.4	Tunikamycin reduserte legumainsekresjon etter 24 timer	30
4.2	Autoaktivering av prolegumain fra M38L-celler	32
4.2.1	Autoaktivering av prolegumain i kondisjonerte medier	32
4.2.2	Autoaktivering av prolegumain i cellelysater	35
4.3	Effekt av glykosaminoglykaner på autoaktivering av prolegumain	37
4.3.1	Kondroitin-4-sulfat (C4S) akselererte autoaktivering av glykosylert prolegumain	37
4.3.2	Effekt av heparansulfat (HS) på autoaktivering av prolegumain	39
4.4	Tunikamycin reduserte legumainaktiviteten og totalproteinkonsentrasjonen i HCT116-cellelysater	40
4.4.1	Økt prolegumain i cellelysater og kondisjonert medium fra tunikamycin-behandlede HCT116-celler	41
4.4.2	Tunikamycin-behandling fører til økt sekresjon av legumain	43
5	Diskusjon	44
5.1	Valg av cellemodeller	44
5.1.1	Valg av tunikamycin som hemmer av N-koblet glykosylering	45
5.2	Effekten av tunikamycin på proteinuttrykk og aktivitet av legumain	46
5.3	Effekten av tunikamycin på autoaktivering av prolegumain	50
5.4	Effekt av tunikamycin på legumain sekresjon	51
5.5	Effekt av glukosaminoglykaner på autoaktivering av prolegumain	53
6	Konklusjon	56
7	Framtidige perspektiver	57
	Litteraturliste	58
	Vedlegg	66

Forkortelsesliste

AEP	Asparaginyln endopeptidase
Asn	Asparagin
Asp	Aspartat
ATP	Adenosintrifosfat
CS	Kondroitinsulfat
C4S	Kondroitin-4-sulfat
DMSO	Dimetylsulfoksid
DMEM	“Dulbecco’s modified Eagle medium”
DTT	Ditiotreitol
Dol-P	”Dolichol phosphatase”
dH ₂ O	Destillert vann
EDTA	Etylendiamintetraacetat
FBS	Føtalt bovint serum, ”Fetal Bovine serum”
FDA	”Food and Drug Administration”
GTP	Guanosin-trifosfat
G418	Geneticin [®]
Gal	Galaktose
GAGs	Glykosaminoglykaner
GalNAc	N-acetyl-galaktosamin
Glc	Glukose
GlcA	Glukuronsyre
GlcN	Glukosamin
GlcNAc	N-acetyl-glukosamin
HCT-116	”Human coloretal adenocarcinoma 116 cells”
HS	Heparansulfat

HEK293	”Human embryonic kidney 293 cells”
HRP	Pepperrot-peroksydase ”Horseradish Peroxidase”
IdoA	”L-iduronic acid”
KDa	Kilodalton
LDS	Litium dodecylsulfat
Man	Mannose
MHC	”Major histocompatibility complex”
MMP-2	Matriksmetalloproteinase 2
M38L	Monoklonal stabil legumain-transfektet HEK 239 cellelinje
N	Asparagine
NaOH	Natriumhydroksid
PBS	Fosfatbufret saltvann
PNGase F	Peptid-N-glykosidase F
rER	”Rough” endoplasmatisk retikulum
SDS	Natriumdodekylsulfat
TBS	”Tris-bufret” saltvann
Z-Ala-Ala-Asn-AMC	Benzyloksykarbonyl-alanin-alanin- asparagin-7- amino-4- metylkumarin

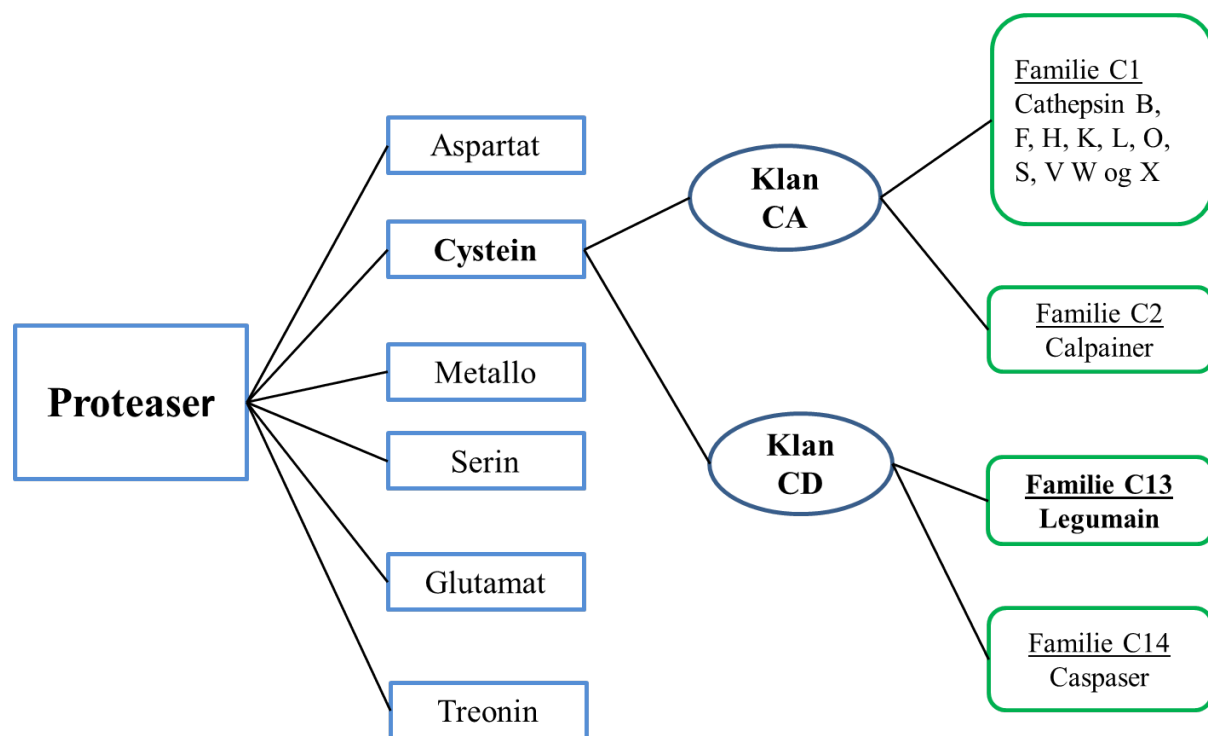
1 Introduksjon

1.1 Proteaser

Proteaser, også kjent som proteolytiske enzymer, spiller en viktig rolle i alle levende organismer [1, 2]. Proteaser bryter ned et polypeptid eller protein ved å kløye peptidbindingene [3]. I mennesker er det omtrent 1000 funksjonelle genene som koder for proteolytiske enzymer, dette utgjør omtrent 2 % av genomet [4]. Selv om alle proteaser har evnen til å bryte ned proteiner, varierer de i mange parametere, slik som størrelse, lokalisering og struktur. Noen proteaser er så små som 20-30 kDa og en vesentlig del består av katalytiske domen(er), slik som cathepsiner av typen cysteinproteaser. Andre proteaser er veldig store proteinkomplekser med flere domener, slik som proteasom. De varierer også i spesifisitet. Noen er veldig selektive, slik som proteaser i koagulasjonskaskaden, mens f.eks. cathepsiner er mindre selektive [5]. Databasen MEROPS klassifiserer proteaser på grunnlag av deres proteolytiske mekanismer inn i ulike klasser. Det er seks ulike klasser som har blitt identifisert; aspartat-, cystein-, glutamat-, metallo-, serin- og treoninproteaser. Disse klassene deles igjen i klaner, som er basert på deres tredimensjonale (3D) struktur. Det antas at proteaser i samme klan kommer fra samme evolusjonære utgangspunkt. En klan kan bestå av mange ulike familier, hvor hver familie har likhet i sin aminosyresekvens [4] (Figur 1.1). Proteaser kan deles inn i eksopeptidase og endopeptidase, avhengig av deres spaltningsposisjon i polypeptidkjeden. Eksopeptidase angriper endene av polypeptidkjeden, hvor de spesifikt kløyver proteinsubstratene enten fra N- eller C-enden (aminopeptidase eller karboksypeptidase). Endopeptidaser vil derimot spalte de indre peptidbindingene [1, 6].

Proteaser kontrollerer en rekke fysiologiske prosesser som er viktig for livet, slik som cellesyklus, celledød, DNA replikasjon, celleproliferasjon, homeostase (for eksempel koagulasjonprosessen), sårheling, immunrespons, matfordøyelse og vevsremodellering [1]. Proteaser har også vist seg å være viktige signalmolekyler, der signaleringen skiller seg fra de fleste andre signaleringsveier ved å være irreversibel [1, 5]. Funksjonene er nøye regulert, og en eventuell ubalansen kan spille en kritisk rolle i en rekke sykdommer, slik som kardiovaskulære sykdommer, kreft, inflammasjon og nevrodegenerative sykdommer [5].

Cysteinproteaser er en av de største proteasegruppene, og deles inn i omtrent 30 forskjellige familier på grunnlag av deres molekylstruktur. Basert på tertiærstruktur, deles cysteinproteaser inn i ulike klaner (for eksempel klan CA og CD) [4, 7]. Det er fire ulike familier (C1, C2, C13 og C14) av cysteinendopeptidaser som er kjent i pattedyr. Familiene C1 (Cathepsin B, F, H, K, L, O, S, V, W og X) og C2 (Calpainer) tilhører klan CA, mens familiene C13 (Legumain) og C14 (Caspaser) tilhører klan CD (Figur 1.1). Den største familien er papainfamilien (C1). Dette er i hovedsak lysosomale enzymer som er ansvarlig for proteolyse i det lysosomale/endosomale systemet. Disse enzymene skilles også ut av cellene og virker ekstracellulært. I den cytosoliske delen av cellen, finnes to andre familier av cysteinendopeptidaser: calpainfamilien (C2) og caspasefamilien (C14). Den fjerde familien er legumainfamilien (C13), og ble i 1997 rapportert som den nyeste identifiserte familien (Figur 1.1). Legumain er primært lokalisert i "late" endosomer og lysosomer, og det sure miljøet anses å være gunstig for den proteolytiske aktiviteten [7].



Figur 1.1: Klassifisering av pattedyrproteaser i følge MEROPS. Proteaser er klassifisert på bakgrunnen av deres katalytiske mekanismer og strukturlikhet. Proteaser er først klassifisert etter deres katalytiske type, aspartat-, cystein-, metallo-, serin-, glutamat-, og treoninproteaser. Proteaser er videre delt inn i klaner, basert på felles evolusjonær opprinnelse slik som lik 3D proteinstruktur eller rekkefølgen av aminosyrer som omfatter den katalytiske delen av polypeptidkjeden. Hver klan er videre delt inn i en eller flere proteasefamilier (grønne bokser) basert på den store likheten i aminosyresekvensen. Figuren er modifisert fra Rawlings, N.*et al.*, (2014) [4].

1.2 Legumain

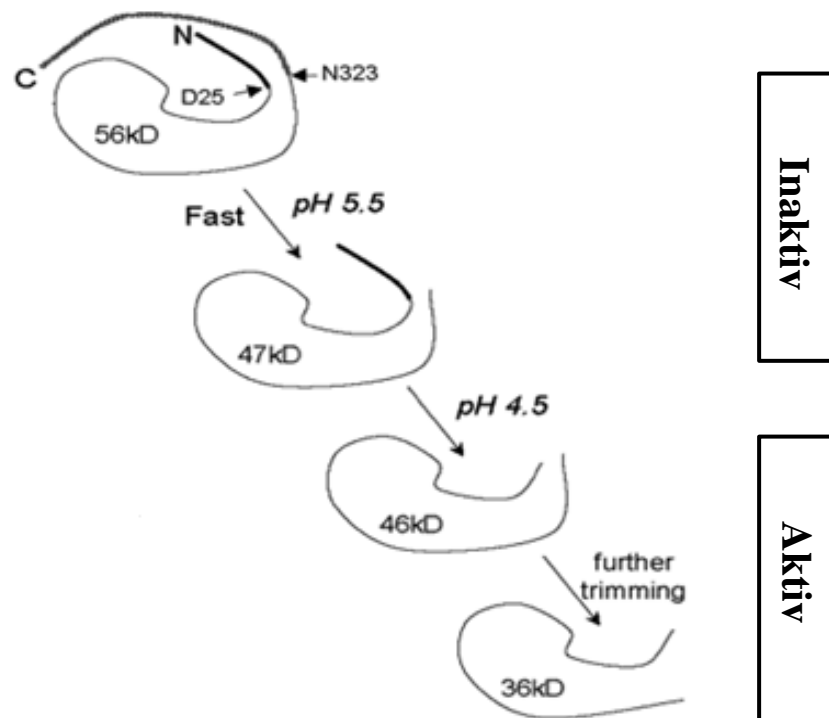
Legumain er en lysosomal asparginylendopeptidase (AEP) og tilhører C13 familien innenfor klan CD av cysteinproteaser (Figur 1.1) [4]. Legumain er ikke beslektet til de kjente cysteinpeptidaser av C1-papainfamilien, slik som cathepsin B, H, L, og S, men er strukturelt beslektet med caspasene (C14), de bakterielle proteasene clostripain (C11) og gingipain (C25) fra de patogene bakteriene *Clostridium histolyticum* og *Porphyromonas gingivalis* [8, 9]. Legumain ble først karakterisert i planter, men ble senere også oppdaget i parasitten *Schistosoma mansoni* og i pattedyr. Chen *et al.* (1997) klarte å klonere og sekvensere legumain fra mennesket [7, 10]. Legumain spalter proteinsubstrater spesifikt på karboksylterminalen av aminosyren asparagin (Asn). Denne spesifikke spaltningen er sjelden blant enzymer [7, 8]. Legumain er den eneste proteasen som er selektiv for Asn i P1 posisjonen av peptidbindingen som spaltes [10]. Senere ble det også påvist at legumain spalter etter aminosyren aspartat (Asp) ved sur pH. Aspartatsyre har pKa på ca. 4,0, og dermed vil man forvente at den er høy protonert når pH reduseres til 3. Asp vil derfor være i protonert form ved pH 3, og være funksjonelt liknende Asn [11]. Eksempel på substrater som er prosessert av legumain er proteinasene cathepsin B, H og L [12]. Legumain blir ikke hemmet av hemmeren E-64, som generelt hemmer enzymer som tilhører til C1-familien. Derimot så hemmes legumain av cystatin C (K_i 0,20 nM), cystatin E/M (K_i 0,0016 nM) og cystatin F (K_i 10 nM), som er endogene hemmere [13].

Cellulær lokalisering av legumain er primært i den lysosomale delen, men er senere også blitt observert i kjernen som proteolytisk aktivt legumain, og i ekstracellulært miljø som prolegumain [14, 15]. Funksjonen som legumain har i cellekjernen er ennå ikke klarlagt [15, 16]. Legumain er uttrykt overalt, men høyest uttrykt i nyrer, morkake, milt, lever og testikler. I tillegg har det også blitt rapportert en oppregulering av ekstracellulært legumain i sammenheng med flere krefttyper [14].

1.2.1 Legumainformer og aktivering

Mammalsk legumain er uttrykt som inaktiv proform på 56 kDa, kalt prolegumain. Prolegumain (56 kDa) består av et katalytisk domene og et C-terminalt prodomene som omfatter et aktiveringspeptid (AP, Lys287-Asn³²³) og et legumain stabilisering- og aktivitetsmodelleringsdomene (LSAM) [17]. En ny studie utført av Zhao *et al.* (2014) beskriver prolegumain eksistens som dimer, og med et "cap" domene som dekker det aktive sete, i motsetning ble den aktive formen (36 kDa) funnet som en monomer [18].

I en studie utført av Li *et al.* (2003) ble vist at endring av pH fra nøytral til sur kan aktivere inaktivt prolegumain (56 kDa) [18]. Når pH er under 5.5 vil C-terminalt propeptid spaltes av legumain ved Asn³²³, og det dannes en intermediær form på 47 kDa (Figur 1.2). Denne formen er inaktiv, men videre reduksjon i pH vil trigge aktiveringen ved å spalte av N-terminalt propeptid ved Asp²⁵ og en aktiv intermediær form på 46 kDa dannes. Det siste trinnet av legumainaktivering er ikke autokatalysert, og skjer etter en normal cellulær prosessering *in vivo*. Ved hjelp av andre lysosomale proteinaser vil den aktive 46 kDa formen omdannes til den modne og fullt aktive 36 kDa formen. Hvilke proteaser som er involvert i dette siste trinnet, er foreløpig ikke kjent [8]. Zhao *et al.* (2014). har nylig vist at den komplekse modningsprosessen er reversibel og pH-avhengig [18]. Disse studiene tyder også på at den postulerte spaltningen ved N-terminal ende kanskje likevel ikke er nødvendig for aktivitet.



Figur 1.2: Legumainformer og aktivering. Mammalsk legumain er uttrykt som prolegumain (56 kDa) som ved lav pH autoaktiveres til den inaktive formen 47 kDa, og videre til den aktive formen av 46 kDa. *In vivo* omdannes den intermediære formen av 46 kDa til den fullt aktive og modne formen av 36 kDa ved hjelp av andre lysosomale proteinaser. Figuren er modifisert fra Li *et al.*, (2003) [8].

1.3 Cellulær transport i forbindelse med glykolysering av proenzymer

Et proenzym er et inaktivt forstadium til et enzym. Som andre proteiner blir proenzymer syntetisert i ribosomer på cytoplasmatiske side av "rough" endoplasmatiske retikulum (rER) og translokaliseres inn i lumen av rER. Translokalisering kan skje enten co- eller posttranslasjonelt (under eller etter syntese). I pattedyrceller er co-translasjonell prosess den vanligste [19, 20]. Nylig syntetiserte proenzymer vil bli utsatt for en rekke co- og posttranslasjonelle modifikasjoner for å oppnå deres endelige funksjonelle tilstand [21, 22].

Proenzymer blir videre transportert ved hjelp av transportvesikler fra rER til Golgi-apparatet. Golgi-apparatet spiller en viktig rolle i modifikasjon av proenzymer. Post-translasjonelle modifikasjoner er viktig for stabilitet av proenzymer, og sørger også for riktig sortering og transport til andre deler av cellen. Proenzymer som går ut fra *trans*-Golgi-nettverk i transportvesikler er tiltenkt til cellens overflate eller andre deler av cellen [21-23].

Legumain blir syntetisert som proenzym i rER og transporteres som proform (56 kDa) til Golgi-apparatet. I rER og *cis*-Golgi-nettverk blir et motiv (mannose-6-fosfat) festet på proformen av legumain. Dette blir deretter sendt videre i vesikler til cellens lysosomer, som er dets hovedlokalisering. Legumain blir deretter aktivert i lysosomer i nærvær av lav pH [24].

1.3.1 Proteinglykosylering

Proteinmodifikasjon har vist seg å være viktig i celleregulering. Modifikasjon av proteiner kan potensielt endre de fysikalske og kjemiske egenskapene, slik som konformasjon, stabilitet, aktivitet og cellulær lokalisering. Det har blitt identifisert over 400 proteinmodifikasjoner, men fosforylering og glykosylering er de mest vanlige og de best studerte. Glykosylering skjer ved at oligosakkarid-enheter blir kovalent festet til polypeptider. Det finnes fem hovedtyper av glykosylering, hvor de hyppigste typene er N-koblet og O-koblet glykosylering [25, 26].

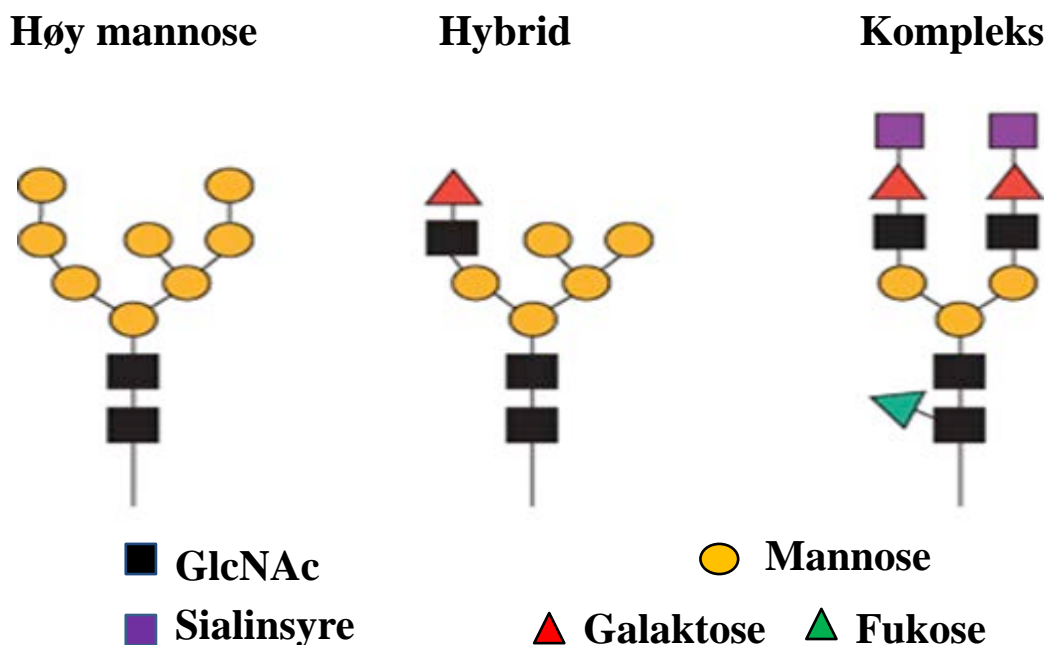
1.3.2 N-koblet proteinglykosylering

N-koblet proteinglykosylering foregår i rER, og involverer binding av høy-mannose oligosakkaridstrukturer til Asn aminosyre-enheter i målproteinene. Denne oligosakkaridstrukturen består av totalt 14 oligosakkarid-grupper [22].

N-koblet glykosylering er en co-translasjonell modifisering som starter i rER og fullføres i Golgi-apparatet. Oppbygningen av N-koblet glykanstrukturen starter på "dolichyl phosphate" i den cytoplasmatiske siden av rER. Etter påsetting av de første syv oligosakkarid-enheterne flippes oligosakkaridet over til lumensiden av rER hvor syntesen fortsetter [22, 27]. Kjernestrukturen til N-koblet glykaner bygges opp ved hjelp av glykosyltransferaser og består av $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$. I lumen av rER blir en fullstendig oligosakkaridstruktur overført "en bloc" til den utvalgte asparagin-aminosyren, mens proteinet translokteres gjennom rER-membranen. De tre terminale glukoseenheterne og en mannose blir fjernet i rER. Dette skjer kun dersom proteinet er riktig foldet. N-glykosylering skjer alltid ved Asn-enheter som er lokalisert innenfor den bestemte sekvensen Asn-X-S/T, der X kan være hvilken som helst aminosyre (unntatt prolin), og S og T er henholdsvis serin og treonin. Det har blitt vist at

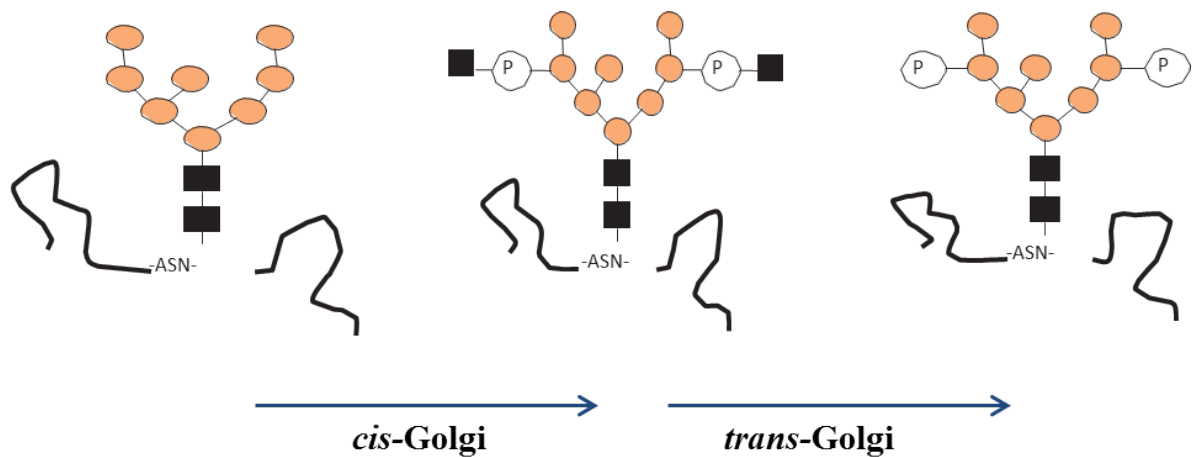
tilstedeværelsen av denne tripeptid sekvensen er nødvendig, men ikke tilstrekkelig for at et protein skal fungere som en akseptor under glykosylerings prosessen[28]. Etter glykosylering kan det skje ytterligere modifikasjoner av oligosakkaridstrukturen i rER og Golgi-apparatet [22, 29, 30].

I Golgi-apparatet blir flere mannoseenheter fjernet før kobling av ulike monosakkarider som GlcNAc, GalNAc, Gal, fukose og sialinsyre oppstår. Det finnes tre hovedtyper av N-koblet oligosakkaridstrukturer, avhengig av oligosakkarid sammensetningen: høy-mannose, hybrid og kompleks (Figur 1.3) [22, 30]. Modifikasjon og binding av ulike oligosakkarid-strukturer til et protein resulterer i mikroheterogenitet av sluttprodukter til glykoproteiner [22, 31].



Figur 1.3: Strukturer av hovedtyper av N-koblet oligosakkarider. Figuren er modifisert fra Shandala *et al.*, (2001) [22].

For proteiner tiltenkt til transport til lysosomer blir et motiv (mannose-6-fosfat) bundet til N-koblet oligosakkarider i *cis*-Golgi-nettverk. Dette motivet blir videre gjenkjent av mannose-6-fosfat-reseptor i *trans*-Golgi – nettverk (Figur 1.4) [22].

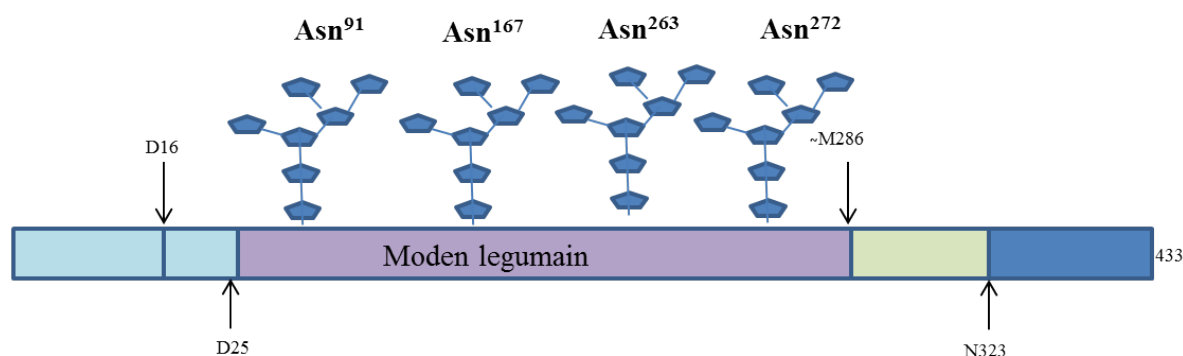


Figur 1.4: N-koblet oligosakkarid målrettetsystem, som er viktig for transport av proteiner til lysosomer. Denne prosessen involverer ulike enzymer som ikke er vist i figuren. De svarte firkantene representerer N-acetylglukosamin oligosakkaridenheter, oransje sirkler representerer mannose oligosakkaridenheter og sirkler med P i midten representerer fosfatenheten. Fjerning av de terminale N-acetylglukosamin oligosakkaridenheter skjer i *trans*-Golgi-nettverk før den transporteres videre til lysosomer. Det er bare proteiner med mannose-6-fosfat motivet (høyre) som blir transportert til lysosomene. Figuren er modifisert fra Shandala *et al.*, (2001) [22].

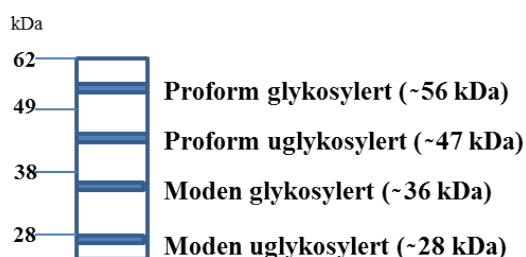
1.3.3 Legumain og N-koblet glykosylering

Det finnes fire potensielle glykosylerings seter for N-koblet glykosylering (Asn⁹¹, Asn¹⁶⁷, Asn²⁶³, Asn²⁷²) i aminosyresekvensen for humant legumain (Figur 1.5 A) [7]. Glykosyleringsmønster av legumain er nylig studert i to kolorektale cellelinjer, HCT116 og SW620, og proteinbåndstørrelse av de uglykosylerte formene av legumain ble estimert (Figur 1.5 B) [32] (Haugen *et al.*, Tumorbiologisk avdeling, Radiumhospitalet, Oslo universitetssykehus). De kolorektale kreftcellene ble behandlet med peptid-N-glykosidase F (PNGase F) et enzym med en bred spesifisitet og som brukes til å undersøke hvilken type glykosylering et protein har [33, 34]. Dette enzymet har evnen til å fjerne alle typer oligosakkarider (høy mannose, hybrid eller kompleks) (Figur 1.3) fra proteiner, og kan spalte bindingen mellom det innerste oligosakkaridet og aminosyresekvensen. Dette resulterer i et fullt deglykosylert protein [33]. Resultatet fra denne studien viste at minst tre av de fire potensielle glykosylerings seter i legumain ble okkupert. Hvilke seter som ble okkupert er imidlertid ikke klarlagt (Haugen *et al.*, upubliserte data).

A)



B)



Figur 1.5: N-koblet glykosylering av legumain. A) De fire potensielle setene for glykosylering (blå) på asparagin (Asn) i legumain. B) Estimert proteinbåndstørrelser av de glykosylerte og uglykosylerte formene av legumain. Figuren er modifisert fra masteroppgave (2014) [32].

1.4 Tunikamycin, en hemmer av N-koblet glykosylering

Tunikamycin er et nukleosid antibiotika isolert fra *Streptomyces lysosuperificus*. Tunikamycin er et effektivt verktøy i biokjemiske studier [35-37], blant annet for å studere tilstedeværelsen eller rollen av N-koblet oligosakkarider i en rekke biologiske systemer [35].

I *in vitro* studier har vist at tunikamycin hemmer spesifikt de første trinnene i biosyntesen av høy-mannose oligosakkarid: overføringen av GlcNAc-1-P til lipid "dolichol phosphatase" (Dol-P). Flere studier tyder på at det kun er overføring av GLcNAc-1-P som blir hemmet, og ikke andre reaksjoner som involverer overføringen av GlcNAc. Dersom dette trinnet blir hemmet *in vivo* så vil ikke lipid-koblet oligosakkarid bli dannet og dermed blir glykosyleringen av protein hindret [35, 37-39]. Den hemmende effekten av tunikamycin er reversibel [35].

Konsentrasjonen av tunikamycin som er beskrevet for å hindre glykosylering varierer mellom 0,1-10 µg/ml [35], der mest kritiske variablene er varigheten av eksponering og

hemningskonsentrasjon. I en tidligere studie ble det foreslått behandlingstid på 24 timer [40]. Dette vil tillate en celle å erstatte de fleste av sine endogene glykoproteiner med glykoproteiner syntetisert under tilstedeværelse av tunicamycin. Inkubasjonstid vil likevel variere avhengig av både hastigheten på metabolismen og av syntesen av proteiner [40].

Det er flere forsiktighetsregler som bør vurderes før bruk av tunicamycin i biokjemiske studier. Dette gjelder spesielt den toksiske effekten av tunicamycin. Tunicamycin kan hemme proteinsyntesen *in vitro* og den blokkerer cellene i fase G1 av cellyklusen. Likevel er ikke alle celler sensitive for denne hemmingen. Det er ikke kjent om tunicamycin hemmer syntesen av alle proteiner, eller om den kun hemmer bestemte typer proteiner [35, 41].

1.5 Glukosaminoglykaner

Glukosaminoglykaner (GAGs) er uforgrenete, negativt ladete hetero-polysakkarider som er kovalent festet til proteiner. Samlet kalles de for proteoglykaner. Proteoglykaner er viktige komponenter av den ekstracellulære matriksen (ECM) i bindevev, og utgjør en stor del av cellens overflate. I tillegg finnes de i intracellulære granula og vesikler, som er deres hovedsted for degradering [42, 43].

GAG-kjedene er sammensatt av sulfaterte repeterende disakkaridenheter av enten *N*-acetyl-galaktosamin (GalNAc) eller *N*-acetylglukosamin (GlcNAc) etterfulgt av en uronsyre slik som D -glukuronsyre (GlcA) eller *L*-iduronsyre (IdoA) [44]. GAGs-kjedene er negativt ladet, noe som skyldes deres innhold av karboksylsyreenheter og/eller modifikasjon av sulfatgrupper [43, 45]. Denne negative ladningen av GAGs kan bidra til interaksjoner med andre proteiner. Variasjonen i sulfateringsmønster i GAG-kjedene tillater dem til å interagere med en rekke ulike proteiner. Dette inkluderer vekstfaktorer, enzymer, cytokiner, kjemokiner, lipoproteiner og adhesjonsmolekyler [43]. Styrken på denne interaksjonen ser ut til å være svært avhengig av den negative ladningstettheten, og ikke den spesifikke strukturen av GAGs [46].

I denne oppgaven er kondroitin-4-sulfat (C4S) og heparansulfat (HS) brukt som eksempler på GAGs. CS består vekslende av *N*-acetyl- D -galaktosamin (GalNAc) og D -glukuronsyre (GlcA)-enheter og kan deles inn i to hovedtyper basert på deres sulfatmønster. Kondroitin-4-

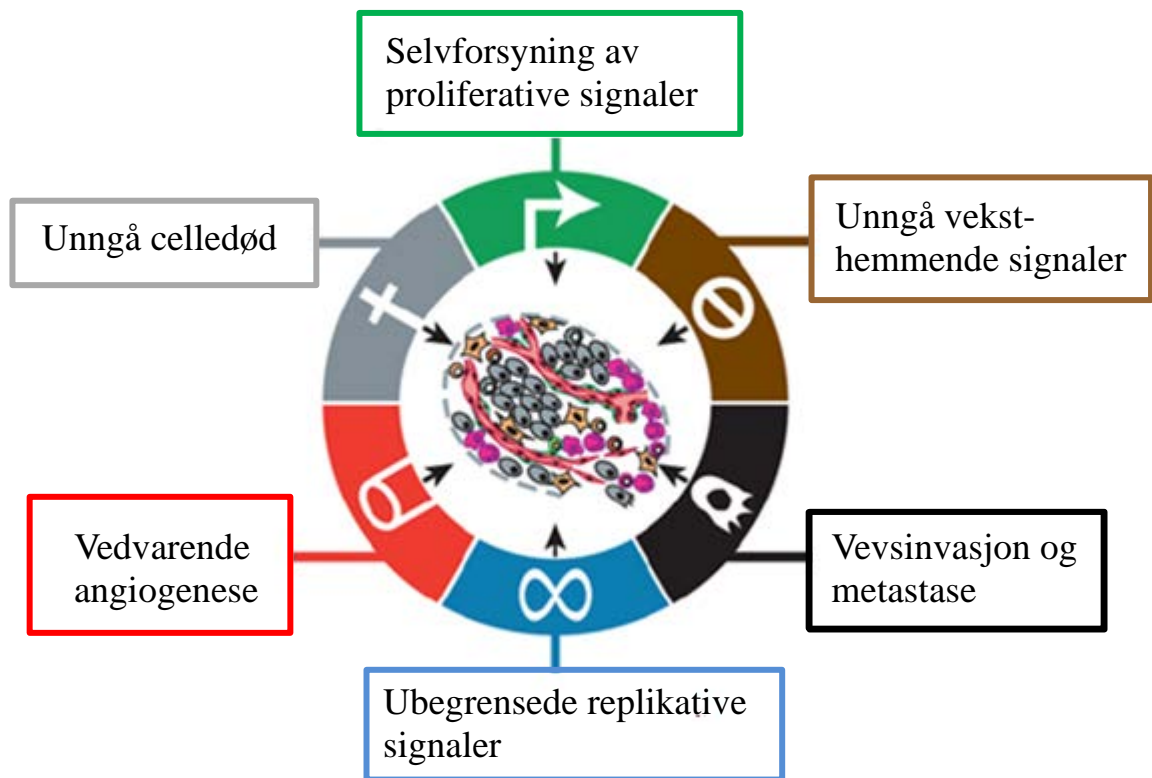
sulfat (C4S; CS-A), kondroitin-6-sulfat (C6S; CS-C) og kondroitin 4,6-sulfat (C4,6S; CS-E) bærer kun O-sulfatert GalNAc-enheter, mens andre CSs bærer sulfatgruppe både på GalNAc- og GlcA-enheter [43]. HS er en kompleks og heterogen familie av makromolekyler, og er sammensatt av linjære sulfaterte polysakkaridkjeder [47]. Den mest vanlige disakkaridenhet inn i heparansulfat er sammensatt av GlcA koblet til GLcNAc [48].

1.5.1 GAGs effekt på autoaktivering av cysteinproteaser

GAGs og den semisyntetiske glukosepolymer dekstransulfat effekt på autoaktivering av flere cysteinproteaser er i en rekke nye studier blitt undersøkt. Det er blant annet blitt funnet at GAGs og dekstransulfat interagerer med og fremmer autoaktivering av flere cysteinproteaser [43], slik som cathepsin B [49-51], cathepsin D [52], cathepsin H [53], cathepsin L [54-56] og cathepsin S [57]. En studie har vist at enzymatisk aktivitet av cathepsin K ser ut til å være avhengig av kompleksdannelse med CS [58]. Legumain har blitt funnet både intracellulært og ekstracellulært, og studier har funnet at legumain blir utskilt av osteoklaster [59] og legumainoveruttrykkende celler [14]. Legumain har også blitt funnet uttrykt på overflaten av kreftceller og kreftassosierte celler [60]. I tillegg til sin lokalisering i lysosomene [43], har Haugen *et al.* nylig observert uttrykk og proteolytisk aktivitet av legumain i kjernen [15]. For å finne mulige effekter av GAGs på legumainaktivering, har Berven *et al.* (2013) studert GAGs med ulike strukturer og ladningstetthet, og funnet at GAGs øker hastigheten av autoaktivering av prolegumain ved sur pH [43]. Prolegumain autoaktivering ble akselerert i nærvær av GAGs på en konsentrasjon-, tids- og pH-avhengig måte.

1.6 Generelle prinsipper ved kreftutvikling

Kreft kjennetegnes av ukontrollert celledeling. Normalt i menneskekroppen foregår det en kontinuerlig celledeling og vekst som styres av spesifikke gener. Mutasjon i disse genene kan føre till tap av kontrollfunksjon, og dermed ukontrollert celledeling. Etter hvert som kreftcellene forsetter å dele seg, oppstår det en opphopning av kreftceller i organet der den ukontrollerte veksten startet. På denne måten dannes det en kreftsvulst som får sitt navn ut fra den type celle som er i ukontrollert vekst og deling [61].



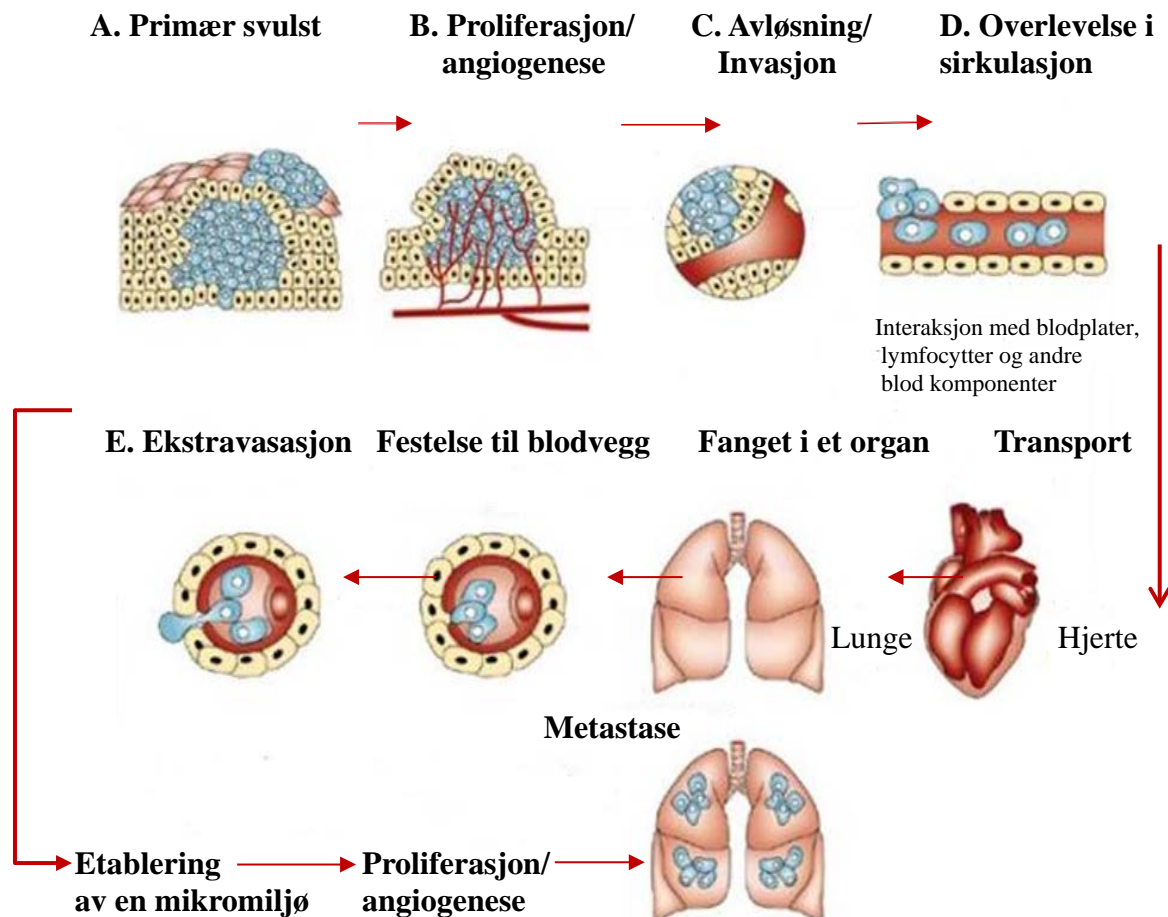
Figur 1.6: Inndeling av kjennetegn på kreftutvikling. Denne figuren illustrerer de seks biologiske mulighetene for kreftutvikling. Figuren er modifisert fra Hanahan *et al.*, (2011) [62].

Kreftceller skiller seg fra normale celler på flere måter og den komplekse kreftutviklingen består av flere trinn. Kompleksiteten av kreftutvikling kan bli oppsummert av seks biologiske kjenetegner, kjent som "Hallmarks of cancer" (Figur 1.6) og inkluderer ubegrenset replikative signaler, unndragning av veksthemmende signaler, unngåelse av celledød, uendelig replikasjon, vedvarende angiogenese, vevsinvasjon og metastase [62].

1.6.1 Invasjon og metastasering

Metastase er den største utfordringen ved beskjempelse av kreft, og det begrenser effektiviteten av behandlingen [63]. Terapieresistent metastase er hovedårsaken bak kreftdødsfall [64]. Metastase omfatter en kompleks rekkefølge av cellebiologiske hendelser som kalles for invasjon-metastase kaskade [65]. Kreftsvulsten kan spres når celler løsriver seg fra sin primærsvulst og føres med lymfe- eller blodårer til andre områder av kroppen [61]. Kreftceller som metastaserer undergår en rekke genetiske og/eller epigenetiske endringer. Metastaseprosessen starter med lokal invasjon, hvor kreftceller forlater sitt primærsted og trenger inn i friskt vev. Når kreftceller kommer inn i sirkulasjonen, vil de spre

seg gjennom den venøse og arterielle sirkulasjonen. Noen av disse cellene kan ende opp sirkulerende i blodet eller i det lymfatiske systemet, mens andre kan feste seg til fjerntliggende steder og starte celledeling (Figur 1.7). Resultatet av invasjon-metastasekaskade er en sekundær svulst, også kjent som metastase [65].



Figur 1.7: Invasjon-metastasekaskaden. Figuren illustrerer hovedtrinnene i dannelsen av metastase. Figuren er modifisert fra Poste, G.*et al.*, (1979) [66].

1.7 Legumain og kreft

Cysteinproteasen legumain som er overuttrykt i flere krefttyper, blant annet tykktarm- [15, 16, 67], bryst- [67-69], og prostatakreft [67, 70], er et potensielt mål for kreftbehandling [67]. Legumain har vist seg å være oppregulert i kreftceller, kreftassosiert endotelceller og i tumorassosiert makrofager [14]. Celler med høyt legumainuttrykk har større evne til å migrere og invadere vevet rundt. Mekanismen bak er ukjent, men en hypotese er at legumain har evnen til å aktivere progelatinase A (pro-MMP-2) til gelatinase A (aktiv-MMP-2) [71]. Den aktive

MMP-2 er viktig i spaltningen av ekstracellulær matriks, og dermed en viktig faktor for kreftceller med tanken på utvikling av mer invasive og metastatiske egenskaper [60]. I en studie ble sammenhengen mellom økt nivå av p53 og legumainuttrykk og -aktivitet i HCT116-celler undersøkt. Resultatene viste at økt nivå av p53 i HCT116-celler kan ha regulerende rolle i modningen og aktiviteten av legumain [72], men det er behov for å studere dette videre. Pasienter med høyt legumainuttrykk i kreftceller har generelt dårlig prognose [60, 67].

1.8 Utnyttelse av proteaser i prodrug-aktivering i kreftterapi

Høy toksisitet og manglende selektivitet er en stor utfordring ved den nåværende kreftbehandlingen. De fleste kjemoterapeutiske midler er toksiske både for kreftceller og normale celler. Dette resulterer i begrenset terapeutisk effektivitet på grunn av deres uønskede effekter [73, 74]. En tilnærming for å øke selektiviteten er å benytte seg av enzymer som aktiverer prodrug, hvor disse enzymene er enten unike for kreftcellen eller er presentert i veldig høye konsentrasjoner i kreftceller sammenlignet med andre celler. Prodrug er definert som et kjemisk modifisert, biologisk inert, småmolekylært legemiddel som blir omdannet *in vivo* for å frigjøre det farmakologisk aktive virkestoffet [73].

Basert på sitt høye nivå i flere humane svulster og sin unike enzymatiske egenskap, er legumain en attraktiv kandidat for selektiv prodrug aktivering i kreftterapi [70]. Legumain er for tiden den eneste kjente humane proteasen som har evnen til å spalte proteinsubstrater spesifikt på den C-terminale siden av aminosyren Asn, og har derfor høy spesifisitet for å spalte prodrugs med Asn-binding [16].

Adectris® (brentuximab vedotin) er et eksempel på et godkjent prodrug for behandling av Hodgkin lymfom. Dette legemidlet blir aktivert ved hjelp av cysteinproteasen cathepsin B [75]. I tillegg er en rekke legumainbaserte prodrugs av doksorubicin, etoposid, auristatin og kolkisin fremstilt [67, 76-78]. Fellestrekk for disse er evnen legumain har til å spalte et prodrug og omdanne det til en aktiv forbindelse. Spaltningen av disse prodrug er basert på en legumain-spesifikk tripeptidsekvens (Ala-Ala-Asn) som er bundet til disse prodrug [78]. Likevel har tidligere mislykkede kliniske studier vist at ytterligere kunnskaper om proteaser, slik som funksjon og lokalisering, er viktig for utvikling av protease-aktivert prodrug [1, 79].

2 Mål med oppgaven

Målene med denne oppgaven er å undersøke følgende problemstillinger:

- Vil manglende glykosylering påvirke cellulær prosessering og aktivitet av legumain?
- Vil manglende glykosylering påvirke evnen prolegumain har til å autoaktivere?
- Vil manglende glykosylering påvirke sekresjonen av legumain?
- Vil ulike konsentrasjoner av tunicamycin påvirke sekresjonen ulikt?
- Vil sekreert uglykosylert prolegumain autoaktivere etter inkubering med GAGs på samme måte som glykosylert (normal) prolegumain?
- Vil GAGs effekt på autoaktivering av prolegumain være konsentrasjonsavhengig?

3 Materialer og metoder

3.1 Kjemikalier og reagenser

Kjemikalier	Leverandør
Albuminstandard (23209)	Thermo Scientific, Rockford, USA
Aceton, C ₂ H ₅ OH	Merck, Darmstadt, Tyskland
Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate (500-0006)	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
CHAPS, C ₃₂ H ₅₈ N ₂ O ₇ S (C3023-IG)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MI, USA
Dinatrium-EDTA, Na ₂ C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₈ (00064)	Ferak, Berlin, Tyskland
Dinatriumhydrogenfosfat, Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O (28029.292)	VWR Prolabo, Fontenay, Frankrike
DMEM "Dulbecco's modified Eagle Medium" (42430-025)	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
DMSO, dimetylsulfoksid, (CH ₃) ₂ SO (D2650)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MI, USA
DTT, ditiotreitol, C ₄ H ₁₀ O ₂ S ₂ (438117)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MI, USA
Edikksyre, CH ₃ COOH (1.00063.1011)	Merck, Darmstadt, Tyskland
FBS, føtalt kalveserum, "fetal bovine serum" (A15-151)	PAA Laboratories, Pasching, Australia
Geit anti-human polyklonal antistoff mot legumain (AF2199)	R&D Systems, Minneapolis, USA
G418Geneticin®, disulfat saltløsning C ₂₀ H ₄₀ N ₄ O ₁₀ x 2H ₂ SO ₄ (060M0812)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MI, USA
Hydrogenklorid, HCl (26614)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MI, USA
Heparansulfat (HS), natriumsalt fra storfenyre	Sigma-Aldrich, St. Louis, MI, USA
Natriumdihydrogenfosfat, NaH ₂ PO ₄ xH ₂ O (6346)	Merck, Darmstadt, Tyskland
Natriumhydroksid, NaOH (6495)	Merck, Darmstadt, Tyskland
Natriumpyrovat-løsning, 100 Mm, C ₃ H ₃ NaO ₃ (S11-003)	PAA Laboratories, Pasching, Australia
Natriumklorid, NaCl (1.06404.1000)	Merck, Darmstadt, Tyskland

Natriumacetat, $\text{NaC}_2\text{H}_4\text{O}_2 \times 3\text{H}_2\text{O}$ (6267.0500)	Merck, Darmstadt, Tyskland
Natriumcitrat, $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \times 2\text{H}_2\text{O}$ (6448)	Merck, Darmstadt, Tyskland
Kondroitin-4-sulfat (C4S), natriumsalt fra storfetrakea	Sigma-Aldrich, St. Louis, MI, USA
NuPAGE® Antioksidant	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
NuPAGE® LDS Sample Buffer (4x)	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
NuPAGE® MOPS SDS Running buffer (20X) (NP0001)	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
NUPAGE® (4-12 % Bis-Tris Gel), Novex® (NP0322)	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
n-oktyl- β -D-glukopyranosid (08001)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MI, USA
Penicillin/Streptomycin (10 000 U/ml) (P11-010)	PAA Laboratories, Pasching, Australia
Polyklonal kanin anti-geit immunoglobulin (P0160)	Dako Cytomation, Glostrup, Danmark
Ponceau løsning (P7170IL)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MI, USA
Precision Plus Protein™ Dual Color Standards (161-0374)	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Restore™ Western Blot Stripping Buffer (21059)	Thermo Scientific, Rockford, USA
Sitronsyre, $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \times \text{H}_2\text{O}$, (1.00244.1000)	Merck, Darmstadt, Tyskland
SuperSignal® WestDura Extended Duration Substrate (34075)	Thermo Scientific, Rockford, USA
Tris (base), $\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$ (T1503)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MI, USA
Tris/Glycin buffer (10x) (#161-0771)	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Tween® 20 (170-6531)	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Trypsin-EDTA 0, 25 % (25200-056)	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
Trypanblått 0, 4 %	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
Tørrmelk	Normilk, Levanger, Norge
Tunikamycin	Calbiochem, Germany
Z-Ala-Ala-Asn-AMC, legumainsubstrat	Bachem, Bubendorf, Sveits

3.2 Utstysrliste

Utstyr	Leverandør
BioHit Optifit tip pipettspisser, 10, 200, 1000 µl	Sartorius Biohit Liquid Handling Oy, Finland
Corning 75 cm ² dyrkningsflaske (3275)	Corning Incorporated, NY, USA
Corning® Transwell®-brett (CLS3422)	Sigma-Aldrich, St-Louis, MI, USA
Costar 6-brønnersbrett (3506)	Corning Incorporated, NY, USA
Costar 96-brønners mikrotiterplate, svart (3915)	Corning Incorporated, NY, USA
Costar® 5 ml pipette (4051) Costar® 10 ml pipette (4101) Costar® 25 ml pipette (4251)	Corning Incorporated, NY, USA
Countess™ Automated Cell Counter	Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
Dri-Block DB-2A	Techne, Cambridge, Storbritannia
ECL Semi-dry Blotters, blottemaskin	Amersham Biosciences, Buckinghamshire, Storbritannia
Heraeus Fresco 21 Centrifuge (75002426)	Thermo Scientific, Rockford, USA
Holten Lamin Air LAF-benk	Medinor, Oslo, Norge
Inkubatorskap (Galaxy 170S)	Eppendorf, CT, USA
Molecular Imager® ChemiDoc Lab™ XRS+ (721BR03414)	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Nunc 96-brønners mikrotiterplate (260836)	Nunc, Roskilde, Danmark
Nitrocellulosemembraner	Hybond-ECL-Amersham, Storbritannia
Olympus CKX41 lysmikroskop	Olympus, Tokyo, Japan
PD MiniTrap G-25	GE Healthcare Bio-Sciences AB, Sverige
SUB Aqua 12 vannbad	Grant, Cambrigde, England
Sentrifugerør (15 ml) (430791)	Corning Incorporated, NY, USA
Sentrifugerør (50 ml) (430921)	Corning Incorporated, NY, USA
The Belly Dancer	Stovall Life Science, Greensboro, NC, USA
Wallac 1420 Victor ³ Multilabel counter, mikroplateleser	Perkin Elmer Life and Analytical Sciences, Boston, MA, USA
XCell SureLock™ Electrophoresis Cell	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA

3.3 Celledyrkning

3.3.1 HCT116-celler

HCT116-celler (American Type Culture Collection, ATCC; CCL-247™) er en adherent kreftcellelinje fra tykk-/endetarmskreftcellelinje (kolorektal) fra human epitel. Denne cellelinjen tilhører "biosafety level" 1 (BSL-1).

3.3.2 M38L-celler

M38L er en stabil monoklonal HEK239-cellelinje tilhørende BSL-2. Den har blitt transfektert med human legumain-cDNA i en pcDNA3,1-vektor (pLGMN) som overuttrykker legumain [14]. Plasmidvektoren som bærer legumain cDNA inneholder også et resistensgen mot antibiotikumet Geneticin ® (G418). G418 er aminoglykosid antibiotika som hemmer funksjonen av ribosomer og dermed vil cellene som er resistente overleve mens andre celler vil dø.

3.3.3 Tining og utsåing av celler

Før utsåing har cellene gjennomgått en langsom nedfrysningsprosess. Under prosessen kan cellene bli skadet, og for å redusere skaden ble det tilsatt DMSO (5 %). Cellene ble oppbevart i flytende nitrogen ved -196 °C [80]. Cellene ble tatt ut av nitrogentanken og tint raskt i 40-60 sekunder på vannbad ved 37 °C. Under hele tiningsprosessen ble ampullen holdt under konstant bevegelse. Deretter ble cellematerialet raskt overført til en celleflaske (10 ml) med ferdig oppvarmet serumholdig dyrkningsmedium (vedlegg 1.1). Cellene ble dyrket ved 37 °C med 5 % CO₂. For å sikre optimale vekstforhold ble mediet skiftet ofte de første dagene.

3.3.4 Splitting av celler

HCT116- og M38L-celler (75 cm² flasker) ble splittet når celletettheten var 70-80 %. Cellene ble splittet omtrent to ganger i uken. Dyrkningsmediet ble fjernet. For å fjerne serum ble cellene vasket med 10 ml serumfritt medium. Deretter ble det tilsatt 2 ml trypsin-EDTA i celleflasken, etterfulgt av plassering i varmeskapet i 2-5 minutter ved 37 °C med 5 % CO₂ for å løsne cellene fra flaskebunnen. Etter 2-5 minutter ble celleflasken tatt ut fra varmeskapet og den ble beveget minst mulig for å hindre celleklumping. Cellene ble studert i mikroskopet for

å kontrollere at cellene har løsnet. Serumholdig medium (10 ml) ble tilsatt celleflaske for å inaktivere trypsin-EDTA. Hele cellesuspensjonen ble deretter overført til 50 ml rør for sentrifugering i 5 minutter ved 800 rpm. Supernatanten ble fjernet, mens cellepelletten ble resuspendert i 10 ml serumholdig medium. Tilslutt ble antall celler telt etter metoden som er beskrevet nedenfor (kapittel 3.3.5). Hver gang M38L-cellene ble splittet ble det tilsatt 160 µl G418 antibiotika til 10 ml serumholdig medium.

3.3.5 Telling av celler

Telling av celler ble utført ved å blande 20 µl av cellesuspensjon med 20 µl trypanblått 0,4 %. Ti µl av denne blandingen ble overført til et tellekammer, og cellene ble telt ved hjelp av automatisk celleteller (CountessTM). Trypanblått farger døde celler blå. Instrumentet teller det totale celleantallet (celler/ml), både antall levende og antall døde celler per ml cellesuspensjon. Antall levende celler/ml brukes for å regne ut hvor mange celler som trenges for det enkelte eksperimentet. Et passende antall celler ble sådd ut i 75 cm² celleflaske (moderflaske) og et ønsket antall ble sådd ut til det eventuelle forsøket i celleflaske/6-brønners brett (5 000 000 celler per 75 cm² celleflaske, 500 000 celler per brønn).

3.3.6 Stimulering med tunikamycin

Det ble utført forsøk i flasker (M38L-celler og HCT116-celler) og 6-brønners brett (HCT116-celler). Cellene ble først vasket forsiktig med serumfritt medium (2 ml til hver brønn, 10 ml til hver flaske). Deretter ble det tilsatt serumfritt medium (vedlegg 1.2) i hver flaske (10 ml) og hver brønn (2 ml) før ulike konsentrasjoner av tunikamycin ble applisert i hver flaske/brønn. Det ble laget flere hjelpeløsninger fra stock-løsning (10 mg/ml) av tunikamycin for å oppnå sluttkonsentrasjoner på 0,01, 0,025, 0,05, 0,1, 1 og 5 µg/ml. Hensikten med dette var å tilsette likt volum av tunikamycinfortynninger (5 µl) til hver brønn. Kontrollen bestod av 5 µl DMSO. Etter inkubasjon på 24, 48 og 72 timer ble kondisjonert medium og cellelysaten høstet (kapittel 3.3.7).

3.3.7 Høsting av HCT116 og M38L-celler

Hver brønn/flaske ble sjekket i mikroskopet for eventuelle løse celler før høsting. Høstingen ble utført både i flasker (M38L-celler og HCT116-celler) og 6-brønners brett (HCT116-celler).

3.3.7.1 Høsting av kondisjonert medium

Høsting av kondisjonerte medium ble utført ved at medium ble fjernet forsiktig og sentrifugert ved 800 x g i 5 minutter. Deretter ble supernatanten fjernet og overført til et nytt eppendorfrør. Eventuelle cellerester i pelletent ble kastet.

3.3.7.2 Høsting av cellelysater

Høsting av cellelysater ble utført ved at cellene ble vasket forsiktig en gang (2 ml hver brønn og 10 ml per flaske) med PBS-løsning (vedlegg 1.3). PBS ble tilsatt forsiktig langs veggene for å unngå at cellene løsnet, deretter ble den fjernet igjen. Videre ble det tilsatt lysisbuffer (vedlegg 1.4), og ved hjelp av mikroskop ble det kontrollert at cellene hadde løsnet. Til hver flaske ble det tilsatt 1,5 ml lysisbuffer. Til brønnene ble det tilsatt 100 µl lysisbuffer, cellene ble skylt og skrapet løse og lysatet ble overført til eppendorfrør. Det ble tilsatt ytterligere 50 µl til hver brønn og cellene ble igjen skylt og skrapet, og dette ble overført til samme eppendorfrør. Cellelysaterne ble deretter frosset ved minus 70 °C i 10 minutter før de ble tint opp igjen på varmeblokk ved 30 °C. Denne prosessen ble gjentatt tre ganger for å sikre at cellene lyserte ordentlig. Cellene ble deretter sentrifugert ved 10 000 x g i 10 minutter ved 4 °C. Cellelysaterne ble deretter sugd av og fordelt i et nytt eppendorfrør. Prøvene ble oppbevart i fryseren (-20 °C) frem til videre analyser.

3.4 Totalproteinmåling

Totalprotein i cellelysaterne ble bestemt ved hjelp av en metode som er beskrevet av Bradford [81]. Dette ble gjort for å kunne korrigere enzymaktiviteten i forhold til proteinmengden. I korte drag går denne metoden ut på å måle konsentrasjonen av totalprotein i cellelysaterne ved å tilsette et fargestoff, Coomassie Plus Protein Assay Reagent. I sur løsning vil dette fargestoffet binde seg til proteiner og det oppstår en endring i absorpsjonsmaksimum fra 465 nm til 595 nm. Fargestoffet har opprinnelig rødbrun farge, men når den reagerer med proteiner vil fargen endre seg til blått. Det er korrelasjon mellom proteinmengde i cellelysaterne og intensiteten av fargen som måles ved absorbans 595 nm. Dette betyr at jo høyere proteinkonsentrasjon er, jo sterkere blir fargen. Bindingen mellom fargestoffet og proteiner er en rask prosess (omtrent to minutter) [81]. Økning i absorbans måles i miktroplateleser

To paralleller av albuminstandard (0, 50, 100, 200, 300 og 400 µg/ml), og tre paralleller fra cellelysater (10 µl) tilsettes i en klar mikrotiterplate. Konsentrasjonen av albuminstandard ble brukt til standardkurve, og denne ble benyttet for beregning av proteinkonsentrasjon i cellelysaterprøver. Bio-Rad-løsningen ble fortynnet 1:5 med destillert vann, og 200 µl av denne fortynningen ble tilsatt i alle brønnene. Mikrotiterplaten ble inkubert i romtemperatur i 5 minutter før absorbansen ble målt i en mikroplateleser (Wallac Victor³ 1420 Multilabel Counter) ved 25 °C og bølgelengde 595 nm. Standardkurven ble brukt for å beregne den totale proteinkonsentrasjonen i cellelysaterprøver.

3.5 Legumainaktivitetsmåling

Metoden som ble benyttet for å måle legumainaktiviteten er hentet fra Chen *et al.*(1997) [7] og Johansen *et al.*(1999) [82]. Aktiviteten av legumain måles ved å bruke et spesifikt fluorescerende peptidsubstrat, Z-Ala-Ala-Asn-AMC. Legumain spalter dette substratet og gir en "leaving group" AMC (4-metyl-7-kumaryl-amid), som har en mye høyere fluorescens når det er fritt enn når det bundet til resten av peptidet. Når AMC spaltes av vil derfor fluorescensen øke.

Prøvene (20 µl) og blindprøve (lysisbuffer, 20 µl) ble tilsatt i tre paralleller i et svart 96-brønners-brett. Mikrotiterplaten ble plassert i mikroplateleser (Wallac Victor³ 1420 Multilabel Counter), og det ble automatisk dispensert 100 µl assaybuffer (vedlegg 3.1) med reduksjonsmiddel (ditiotreitol, DTT) i hver brønn. DTT tilsettes for å aktivere cysteinproteasene. For å sikre tilstrekkelig aktivering, ble det ventet 10 minutter før 50 µl av substratløsningen (34 µM) (vedlegg 3.2) ble tilsatt automatisk og umiddelbart før målingen slik at sluttkonsentrasjonen ble 10 µM. Mikrotiterplaten ble ristet i ti sekunder etter tilsetningene og i tre sekunder før hver måling. Repeterte målinger ved 360 nm for eksitasjon og 460 nm for emisjon måler økningen i fluorescens over tid (ca. 30 minutter for M38L-celler, og ca.1 time for HCT116-celler) og økningen i fluorescens per sekund ($\Delta F/\text{sek}$) ble deretter automatisk kalkulert i mikroplateleseren [82].

3.6 Autoaktivering av legumain

I denne metoden ble PD MiniTrap G-25 benyttet for å oppnå et surt medium som etterlignet det sure miljøet i lysosomene, slik at prolegumain kan autoaktiveres. Denne metoden ble utført ved å endre pH i kondisjonert medium og cellelysate fra M38L- celler fra nøytral til 4,0. Dette kan utføres ved hjelp av to ulike protokoller, gravitasjonsprotokoll og spinnprotokoll. I denne oppgaven ble kun spinnprotokoll (kapittel 3.6.1) brukt for autoaktivering av prolegumain. Kolonnen var ikke koblet til pumpe, detektor eller fraksjonssamler, slik at eluatet ble samlet opp manuelt under eluering. Prolegumain ble eluert ut med en sur autoaktiveringsbuffer (pH 4,0) (vedlegg 4.1). Autoaktivering startet umiddelbart og enzymaktivitet ble målt (kapittel 3.5) ved ulike tider. I tillegg ble prøver for elektroforese og immunblotting (kapittel 3.7) laget.

3.6.1 Spinnprotokoll

Kolonnen ble vasket med autoaktiveringsbuffer (vedlegg 4.1), og det ble brukt omtrent 8 ml av autoaktiveringsbuffer totalt. I siste vasketrinn ble kolonnen spunnet ved 1000 x g i 2 minutter i sentrifuge (Heraeus Fresco 21). Væsken som kom ut ble kastet, og kolonnen ble plassert i et nytt samlingsrør. Deretter ble 0,5 ml av prøven tilsatt kolonnen. Eluering skjedde ved å sentrifugere i 2 minutter ved 1000 x g. Eluatet ble samlet opp og analysert ved hjelp av legumainaktivitetmåling (kapittel 3.5). I denne prosedyren skjedde det ingen fortynning av prøven.

3.7 Elektroforese og immunblotting

Immunblotting benyttes for å påvise spesifikke proteiner i biologiske prøver, for eksempel i serum. I denne oppgaven ble metoden utnyttet for å påvise legumain i cellelysater og kondisjonerte medier av HCT116- og M38L- celler.

Totalproteinmåling (kapittel 3.4) ble brukt for å beregne tilsetning av lik mengde totalprotein i hver brønn. Cellelysate ble dermed fortynnet i lysisbuffer (vedlegg 1.4) for å oppnå den ønskede mengden av totalprotein i hver applisert prøve. I tillegg ble det også utført en oppkonsentrering av proteinene i cellemediene ved hjelp av acetonfelling før

immunoblotting. Dette ble utført ved å tilsette 80 % iskald aceton og 20 % prøveløsning, som ble plassert i en time i fryseren (-20 °C). Deretter ble prøven sentrifugert i 20 minutter ved 15 000 x g og 4 °C. Supernatanten ble pipettert forsiktig av. Proteinpellet ble tørket i omtrent 15-20 minutter før den ble løst opp i vann (13 µl), DTT (2 µl) og 4 x Sempel Buffer (5 µl) (elektroforeseprøve; vedlegg 5.5).

Litium dodecylsulfat (LDS, erstatter SDS, i Sample Buffer) er en detergent som denaturerer sekundære og ikke-disulfidbundet tertiære strukturer. LDS sikrer at polypeptidene får en uniform negativ ladning, slik at de kan separeres etter molekylvekt (kDa) i elektroforesen [83]. LDS og oppvarming denaturerer proteinet av interesse. DTT er et reduksjonsmiddel som hjelper for videre denaturering av proteinene ved at disulfidbindingene i proteinstrukturen brytes opp.

I et elektroforesekar ble polyakrylamidgelen (NuPAGE ® 4-12 % Bis-Tris Gels) plassert og fylt opp med 800 ml elektroforesebuffer (vedlegg 5.1). Deretter ble det tilsatt 500 µl antioksidant i elektroforesebufferen. Prøve og "Precision Plus Protein standard" ble deretter applisert på polyakrylamidgelen i den enkelte brønn. Elektroforesen gikk med 200 volt i 50 minutter, og proteinene beveger seg mot den positive elektroden og de separeres etter størrelse.

Etter separasjonen ble proteinene overført til en nitrocellulosemembran ved hjelp av blottebuffer (vedlegg 5.2) og en blottemaskin med 32 mA per gel i 1 time. Etter 1 time ble membranen tatt ut og farget med Ponceau løsning i et minutt, som farger proteiner rosa/rødt. Ponceau ble tilsatt for å kontrollere effektiviteten av proteinoverføringen (blottingen). Den ble lett skylt bort fra membranen ved hjelp av vann og 1x T-TBS (vedlegg 5.4). Videre ble det tilsatt blotto-løsning (vedlegg 5.3) til membranen, for å hindre ikke-spesifikk binding av antistoff til membranen. Hensikten med dette er å redusere bakgrunnstøy og eliminere ikke-spesifikke bånd. Membranen har egenskapen til å binde proteiner. Siden både antistoffer og deres mål er proteiner, er det viktig å hindre uspesifikke interaksjoner mellom membranen og det antistoffet som benyttes for påvisning av målprotein. Melkeproteinene binder seg til membranen på alle steder der prøveproteiner ikke har bundet seg. Når antistoffet tilsettes, vil det ikke være plass til å feste proteiner på membranen noe annet sted enn på bindingssetet på det spesifikke målprotein. For å detektere legumain på membranen ble det tilsatt et primært antistoff (Geit anti-human polyklonalt antistoff mot legumain, 1:1000), som ble inkubert over

natt i kjølerom og deretter et sekundært antistoff (kanin anti-geit immunoglobulin/HRP, 1:5000) i en time ved romtemperatur. Primærantistoffet er spesifikt for det proteinet som vi ønsker å påvise, og sekundært antistoffet er spesifikt for primærantistoffet. Sekundære antistoffet er konjugert til enzymet pepperrot-peroksydase (Horseradish Peroxidase, HRP), og ved tilsetning av "SuperSignal® WestDura Extended Duration Substrate" vil det dannes en kjemisk reaksjon som resulterer i dannelse av en kjemiluminescerende lys-kompleks. Dette lyset detekteres ved hjelp av Molecular Imager® ChemiDoc™ XRS⁺. Stripping av membranen ble utført ved å vaske membranen med T-TBS (vedlegg 5.4), og deretter ble membranen strippet med strappingsbuffer i 15 minutter. Videre ble membranen vasket igjen med T-TBS, og blokkert i blotto-løsning (vedlegg 5.3) i en time før tilsetning av nytt primær (Geit anti-human polyklonalt antistoff mot legumain, 1:200) og sekundært (kanin anti-geit immunoglobulin/HRP, 1:5000) antistoff som beskrevet ovenfor.

3.8 ELISA

Konsentrasjonsbestemmelse av legumain ble gjort med en kommersiell ELISA-metode (DY4769; R&D systemer) og utført av overingeniør Hilde Nilsen.

3.9 Statistiske analyser

Dataene i denne oppgaven er presentert som gjennomsnitt \pm "standard error of the mean" (SEM). Gjennomsnittverdiene er beregnet fra parallellene i forsøkene og antall forsøk (n) varierer fra 1-5. Det er valgt signifikansnivå på $p < 0,05$ og to-utvalgs t-test (paret test) er benyttet som statistikk modell. Alle statistiske analysene ble utført ved hjelp av GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA). Ikke-parametrisk analyse (Wilcoxon matched-pairs signed rank test) ble benyttet ettersom det ikke kunnet antas normalfordeling av data. Målinger ble ansett som statistisk signifikant forskjellige ved en p-verdig $<0,05$. Dette er figurer angitt med en stjerne (*) mens to stjerner (**) betyr $p < 0,01$.

4 Resultater

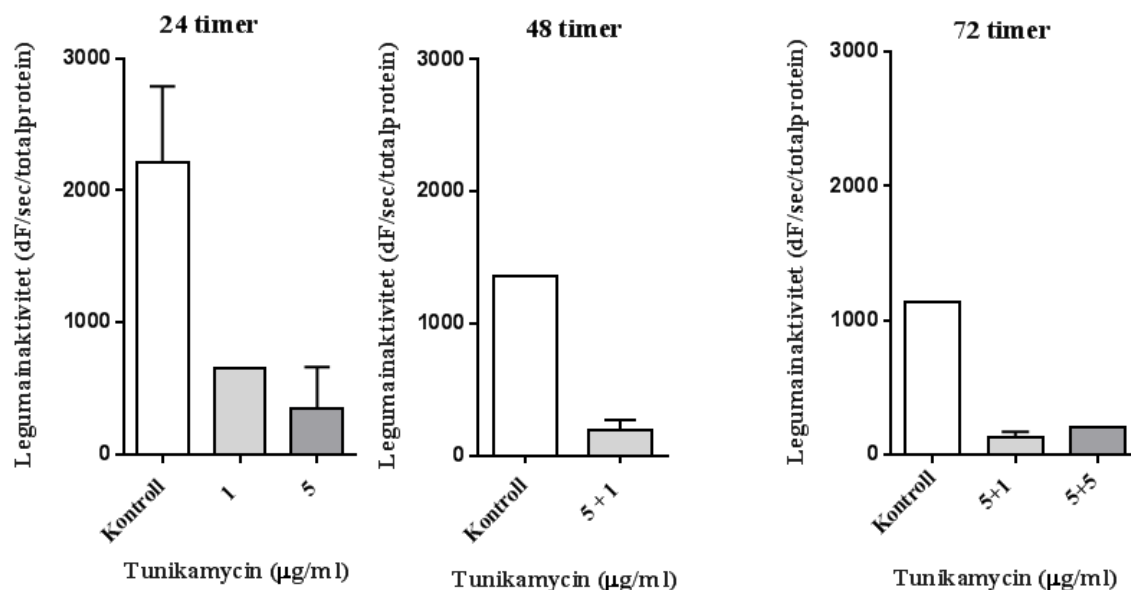
4.1 Innledende forsøk med M38L-celler

M38L (monoklonal HEK293-cellelinje som overuttrykker legumain) ble benyttet som cellemodell for å undersøke effekten av tunikamycin ved ulike tider og konsentrasjoner. Ved å behandle M38L-cellene med tunikamycin ønsket man å oppnå uglykosylertform av legumain. Det ble sådd ut $5,0 \times 10^6$ M38L-celler i flasker, og deretter ble cellene eksponert for ulike konsentrasjoner tunikamycin (0, 1 og 5 $\mu\text{g/ml}$) i henholdsvis 24, 48 eller 72 timer før høsting. Etter 24 og 48 timer ble kondisjonert medium skiftet til nytt medium, og det ble tilsatt enten samme konsentrasjon som før, eller en ny tunikamycinkonsentrasjon (5 + 5 eller 5 + 1 $\mu\text{g/ml}$) til cellene. Kontrollcellene ble behandlet med 5 μl DMSO (DMSO-kontroll). Kondisjonert cellemedium, cellelysater fra kontroll og tunikamycinbehandlede celler etter 24, 48 og 72 timer ble brukt for videre analyse.

4.1.1 Tunikamycinbehandling førte til nedgang i legumainaktiviteten i M38L-celler

Tunikamycinbehandling ga morfologisk endring i cellene, for eksempel at cellene hadde krympet og så generelt annerledes ut enn i DMSO-kontroll. Den største effekten ble registrert etter 72 timers behandling med tunikamycin, der cellene var løsnet i større grad enn etter 48 timers inkubering.

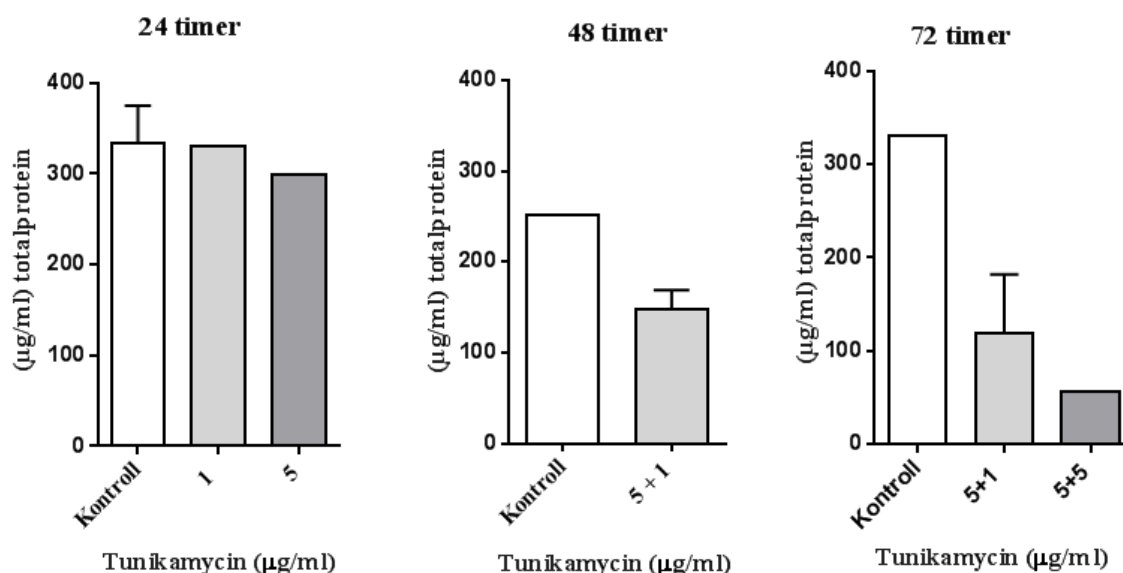
Legumainaktiviteten (dF/sec) ble målt i cellelysatene etter 24, 48 og 72 timer ved å bruke et spesifikt fluorescerende peptidsubstrat (Z-Ala-Ala-Asn-AMC), der resultatet ble korrigert for totalproteinkonsentrasjon (Figur 4.1). Videre inkubering utover 24 timer med enten 1 eller 5 $\mu\text{g/ml}$ tunikamycin så ut til å redusere aktiviteten noe mer. Effekten av de to konsentrasjonene 1 og 5 $\mu\text{g/ml}$ så ut til å være tilsvarende (Figur 4.1).



Figur 4.1: Legumainaktivitet i M38L-cellelysater etter 24, 48 og 72 timers behandling med tunikamycin. M38L-celler ($5,0 \times 10^6$) ble behandlet med ulike konsentrasjoner av tunikamycin (0, 1 og 5 µg/ml) og inkubert i 24, 48 og 72 timer ved 37 °C. Konsentrasjonene 5 + 1 og 5 + 5 µg/ml betyr at cellene først ble behandlet i 24 timer med konsentrasjon 5 µg/ml og deretter henholdsvis 1 eller 5 µg/ml og høstet etter totalt 48 eller 72 timer. Kontrollen er 5 µl DMSO. Legumainaktiviteten (dF/sec) i cellelysaten ble målt ved å bruke et spesifikt fluorescerende peptidsubstrat (Z-Ala-Ala-Asn-AMC) og ble korrigert for den totale proteinkonsentrasjonen (dF/sec/totalprotein) (n=1-3).

4.1.2 Redusert totalproteinkonsentrasjon i M38L-cellelysater etter behandling med tunikamycin

Det var ønskelig å undersøke om tunikamycin reduserte den totale proteinkonsentrasjonen i cellelysater fra M38L ved ulike konsentrasjoner og eksponeringstider. Størst reduksjon i den totale proteinkonsentrasjonen ble observert etter 72 timer eksponering for tunikamycin, men uten særlig forskjell mellom konsentrasjonene 1 og 5 µg/ml de siste 48 timene. Målingene etter 24 timer viste ingen reduksjon i den totale proteinkonsentrasjonen (Figur 4.2).



Figur 4.2: Totalproteinkonsentrasjon i M38L-cellelysater etter 24, 48 og 72 timers behandling med tunikamycin. M38L-celler ($5,0 \times 10^6$) ble behandlet med ulike konsentrasjoner av tunikamycin (0, 1 og 5 µg/ml) og inkubert i 24, 48 og 72 timer ved 37 °C. Konsentrasjonene 5 + 1 og 5 + 5 µg/ml betyr at cellene først ble behandlet i 24 timer med konsentrasjon 5 µg/ml og deretter henholdsvis 1 eller 5 µg/ml og høstet etter totalt 48 eller 72 timer. Kontrollen er 5 µl DMSO. Totalproteinkonsentrasjon (µg/ml) i cellelysater ble målt etter 24, 48 og 72 timers inkubering med tunikamycin (n= 1-3).

4.1.3 Effekt av tunikamycin på proteinuttrykket av legumain i cellelysater og kondisjonerte medier

For å undersøke hvilke former av legumain som dannes når cellene behandles med tunikamycin, ble proteinuttrykket av legumain undersøkt både i cellelysater og kondisjonerte medier, ved ulike tider og konsentrasjoner.

Immunoblotting av de kondisjonerte mediene (brønn 1-6, tabell 1):

Immunoblotting av de kondisjonerte mediene (Figur 4.3, tabell 1) viste et sterkt proteinbånd av normalt, glykosylert prolegumain (56 kDa) i DMSO-kontrollen (brønn 6). Når M38L-cellene ble eksponert for tunikamycin (1 µg/ml) i 24 timer ble det observert to nye proteinbånd med en lavere molekylvekt (brønn 5). Ved en høyere konsentrasjon av tunikamycin (5 µg/ml) dominerte proteinbåndet med lavest molekylvekt (brønn 1 og 3), selv om normalglykosylert prolegumain var til stede. Videre dyrking av cellene utover 24 timer, etter fjerning av medium og med tunikamycin fortsatt til stede, medførte at normalglykosylert proform var helt fraværende og erstattet av lavere molekylvektsformer (brønn 2 og 4).

Immunoblotting av cellelysater (brønn 7-11, tabell 2):

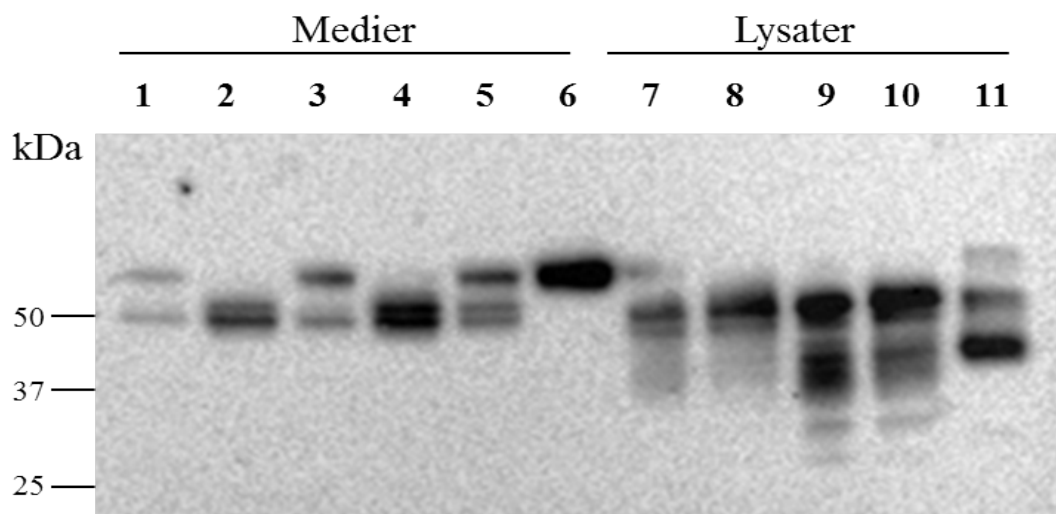
Immunoblotting av cellelysater fra DMSO-kontrollen viste at denne inneholdt den glykosylerte proformen (56 kDa), den intermediære formen av legumain (46 kDa) og den aktive, modne formen av legumain (36 kDa) (Figur 4.3, brønn 11; tabell 2). I brønnene for tunikamycin-eksponert cellelysater (brønn 7-10) ble det observert fravær av glykosylert prolegumain og akkumulering av et bånd med molekylvekt i underkant 50 kDa. Den aktive modne formen på 36 kDa ble også observert (brønn 7-11, Figur 4.3). I tunikamycinbehandlede celler ble det påvist flere proteinbånd med lavere molekylvekt enn i kontrollen og det ble observert flest molekylvektformer i cellene som ble behandlet med 5 og 1 µg/ml i 24 timer (brønn 9 og 10). Det ble også observert en form ved ca 28 kDa i brønn 9 og 10.

Tabell 1: Oversikt over immunoblotting av kondisjonerte medium fra M38L-celler

Brønn	1	2	3	4	5	6
Tunikamycin (µg/ml):	5	5 + 1	5	5 + 1	1	0
Høstet etter (timer):	24	24 + 24	24	24 + 48	24	24

Tabell 2: Oversikt over immunoblotting av cellelysater fra M38L-celler

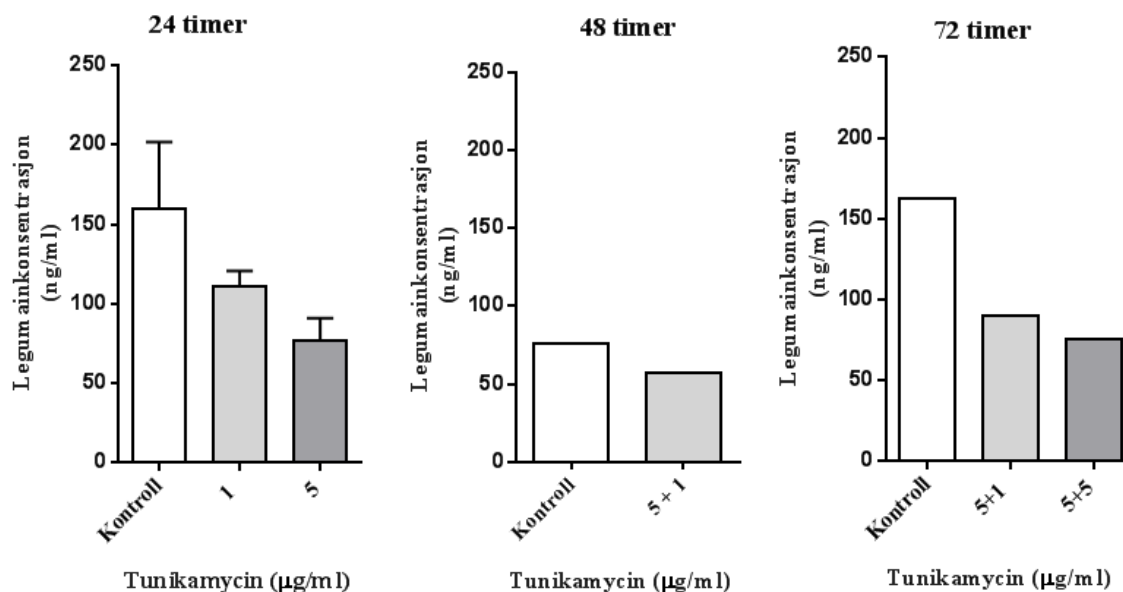
Brønn:	7	8	9	10	11
Tunikamycin (µg/ml):	5	5 + 1	5	1	0
Høstet etter (timer):	48	24 + 48	24	24	24



Figur 4.3: Immunoblott av cellelysaten og kondisjonerte medier fra M38L-celler, respektivt behandlet med og uten tunikamycin, med ulike konsentrasjoner og eksponeringslengder. M38L-celler ($5,0 \times 10^6$ celler/flaske) ble behandlet med ulike konsentrasjoner (1 og 5 $\mu\text{g/ml}$) av tunikamycin i 24 48 og 72 timer (tabell 1 og 2). Kontrollcellene ble behandlet med 5 μl DMSO. Uttrykk av legumain i kondisjonerte medier (brønn 1-6) og i cellelysaten (brønn 7-11, 2 μg totalprotein) ble analysert ved hjelp av polyakrylamidgelelektroforese og immunoblotting. Et representativ blott ble analysert ved hjelp av et spesifikt antistoff for legumain ($n=1-3$).

4.1.4 Tunikamycin reduserte legumainsekresjon etter 24 timer

Det var ønskelig å undersøke effekten av tunikamycin på legumainsekresjon sammenlignet med DMSO-kontroll etter 24, 48 og 72 timer. M38L-celler ($5,0 \times 10^6$ celler/flaske) ble inkubert i 24, 48 og 72 timer med og uten tunikamycin (0, 1 og 5 $\mu\text{g/ml}$). Konsentrasjonsbestemmelse av legumain i mediene ble gjort med en kommersiell ELISA-metode. M38L-cellelinjer ble behandlet med forskjellige konsentrasjoner og eksponeringslengder av tunikamycin. Eksponering ved forskjellige konsentrasjoner av tunikamycin i 24, 48 og 72 timer førte til redusert sekresjon av legumain, målt ved redusert protein-konsentrasjon i celle-mediene (Figur 4.4).



Figur 4.4: Effekten av tunikamycin på sekresjonen av legumain etter 24, 48, og 72 timer. Effekten av tunikamycin (0, 1 og 5 µg/ml) på sekresjonen av legumain fra M38L-celler ($5,0 \times 10^6$ celler/flaske) ble målt ved hjelp av en ELISA-metode etter 24, 48 og 72 timers behandling. Konsentrasjonene 5 + 1 og 5 + 5 µg/ml innebærer at cellene først ble behandlet i 24 timer med konsentrasjon 5 µg/ml og deretter med henholdsvis 1 eller 5 µg/ml, og høstet etter totalt 48 eller 72 timer. Kontrollen er 5 µl DMSO (n= 1-3).

Oppsummering av innledende eksperimenter med effekter av tunikamycin på M38L:

Med utgangspunkt i velkjente effekter av tunikamycin på N-glykosylering kan de innledende forsøkene oppsummeres slik:

- De anvendte konsentrasjonene av tunikamycin (1 til 5 µg/ml) hadde en viss toksisk effekt på cellene som vist gjennom en redusert proteinkonsentrasjon i cellelysaten.
- Celler dyrket med tunikamycin uttrykker lavere legumainaktivitet også etter korreksjon for lavere total proteinkonsentrasjon.
- Etter tunikamycinbehandling viste immunoblotting av cellelysater flere uglykosylerte proteinformer av legumain.
- Sekresjonen av legumain reduseres ved tunikamycinkonsentrasjonene 1 og 5 µg/ml og etter 24 timer ble bare uglykosylert proform observert i kondisjonert medium.

4.2 Autoaktivering av prolegumain fra M38L-celler

Det er tidligere beskrevet at en pH-endring fra nøytral til 4,0 vil føre til autoaktivering av prolegumain til en aktiv mellomform med en molekylvekt på 46 kDa [8]. Det var derfor interessant å undersøke om den uglykosylerte formen av prolegumain, som dannes etter behandling med tunikamycin også autoaktiveres. Autoaktivering av uglykosylert og glykosylert prolegumain ble undersøkt både i cellelysater og i kondisjonerte medier.

M38L-celler ($5,0 \times 10^6$ celler/flaske) ble stimulert med ulike konsentrasjoner (0, 1, 5 og 5+1 $\mu\text{g/ml}$, se tabell 1 og 2) tunikamycin i 24, 48 og 72 timer før høsting av cellelysater og kondisjonerte medier. Autoaktivering av prolegumain ble utført etter en metode som er beskrevet i kapittel 3.6. Ved autoaktivering av prolegumain ble pH i kondisjonerte medier og cellelysater endret fra nøytral pH til 4,0. Etter surgjøring til pH 4,0 ble både cellelysater og de kondisjonerte mediene inkubert ved 37 °C i ulike tider.

Etter autoaktivering ble legumainaktivitetsmåling (kapittel 3.5) utført, og proteinuttrykk av legumain ble benyttet for å undersøke hvilke former som ble dannet etter autoaktivering av prolegumain (kapittel 3.7).

4.2.1 Autoaktivering av prolegumain i kondisjonerte medier

For å studere tunikamycineffekt på autoaktivering av prolegumain ble kondisjonerte medier fra M38L-celler benyttet etter behandling med 1 eller 5 $\mu\text{g/ml}$ tunikamycin i 24 timer og ble sammenlignet med DMSO-kontrollen (Figur 4.5 A). For å studere denne effekten ble legumainaktiviteten målt ved ulike tidspunkter (0, 0,5, 1, 2, 4, 6 og 18 timer). Tiden 0 tilsvarer tiden umiddelbart etter surgjøring til pH 4,0. Videre ble medier behandlet med 5 $\mu\text{g/ml}$ tunikamycin (24 timer) sammenlignet med medier som ble først behandlet med 5 $\mu\text{g/ml}$ tunikamycin og deretter med 1 $\mu\text{g/ml}$ (i total tid 48 eller 72 timer) (Figur 4.5 B). I kontrollmediet ble maksimal autoaktivering observert etter 2 timer (Figur 4.5 A).

Legumainaktiviteten (dF/sec) av prolegumain fra tunikamycinbehandlede celler (1 og 5 $\mu\text{g/ml}$) i 24 timer kan se ut til å være økt allerede etter 0,5 time ved inkubering ved 37 °C. Det ble detektert størst økning mellom 2 og 6 timer. Videre ble det observert nedgang i legumainaktivitet etter 18 timer ved både tunikamycinkonsentrasjon 1 og 5 $\mu\text{g/ml}$.

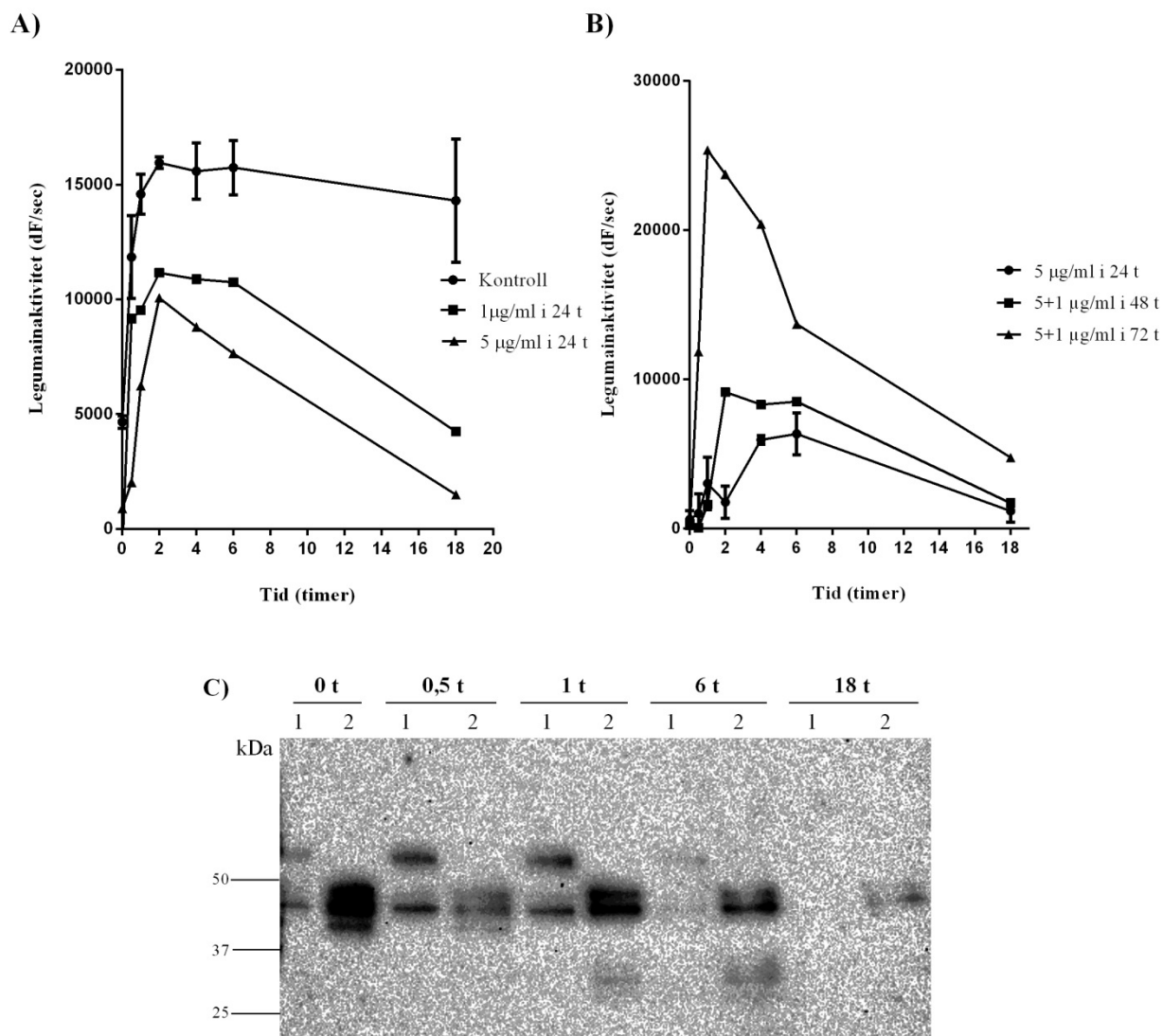
Sammenligning av disse tre kurvene med hverandre indikerer at tunikamycinbehandling av celler førte til redusert autoaktivering av prolegumain (Figur 4.5 A).

Videre undersøkte vi graden av autoaktivering av prolegumain i det kondisjonerte mediet fra celler med 5 µg/ml (24 timer) eller 5 + 1 µg/ml (totalt 48 eller 72 timer) tunikamycin (Tabell 1). Det ble observert høyere aktivitet i medier fra celler som ble behandlet med tunikamycin i 72 timer, sammenlignet med 24 og 48 timer. Resultatene indikerer lite autoaktivering av prolegumain i celler som ble behandlet med 5 µg/ml tunikamycin i 24 timer. Totalt ble det observert høyest aktivitet ved 1 time (24 + 48 timer), 2 timer (24 + 24 timer) og 4 timer (24 timer). Resultatene viste at legumainaktiviteten generelt ble redusert etter 18 timer (Figur 4.5 B).

Immunoblotting av de kondisjonerte mediene fra autoaktivert prolegumain sekretet fra tunikamycinbehandlede celler (5 µg/ml i 24 timer og 5 + 1 µg/ml i totalt 72 timer), viste at ulike former av legumain var til stede ved 0, 0,5, 1, 6 og 18 timer.

Det ble observert en blanding av den glykosylerte og uglykosylerte formen av legumain etter eksponering for tunikamycin (5 µg/ml) i 24 timer. Glykosylert prolegumain på 56 kDa ble observert ved 0, 0,5 og 1 time, men ble kun observert som en svak skygge etter 6 timer, og forsvant totalt etter 18 timer. Uglykosylert prolegumain på 47 kDa ble observert ved 0, 0,5, 1, og 6 timer, men forsvant totalt etter 18 timer. Den intermediære, uglykosylerte formen av legumain ble ikke observert ved 5 µg/ml tunikamycin i 24 timer (brønn 1, Figur 4.5 C).

Ved bytte av mediet etter 24 timer, ble den glykosylerte formen av legumain ikke observert. Det ble observert to til tre ulike former av legumain ved 0 - 6 timer. Disse formene av legumain kan representere ulik grad av glykosylering. Mer uglykosylert form av legumain ble observert ved 0 timer sammenlignet med de andre tidene. Den uglykosylerte proformen av legumain ved 47 kDa ble observert ved 0 - 6 timer, men en svak skygge ved 18 timer antas også å være denne formen. To svake proteinbånd ble observert ved 31 og 32 kDa etter 1 og 6 timer (molekylvekt beregnet ved hjelp av programmet Image Lab® versjon 5.2.1), og antas å være den intermediære, aktive formen av legumain (brønn 2, Figur 4.5 C).



Figur 4.5: Autoaktivering av prolegumain i de kondisjonerte mediene. M38L-celler ($5,0 \times 10^6$ celler/flaske) ble behandlet med ulike konsentrasjoner av tunikamycin (1 eller 5 µg/ml) i 24, 48 og 72 timer (t). Tunikamycin 5 + 1 µg/ml betyr at cellene ble først behandlet med 5 µg/ml i 24 timer, og deretter 1 µg/ml i ytterligere 24 (totalt 48) og 48 (totalt 72) timer. Kontrollen er 5 µl DMSO. Prolegumain fra de kondisjonerte mediene ble autoaktivert ved å endre pH fra nøytral til 4,0 (metode beskrevet i kapittel 3.6). Etter surgjøring til pH 4,0 ble prolegumain inkubert ved 37 °C, og analysert ved hjelp av metoden beskrevet i kapittel 3.5 og 3.7. Legumainaktivitet (dF/sec) ble målt ved å bruke et spesifikt fluorescerende peptidsubstrat (Z-Ala-Ala-Asn-AMC). Legumainaktiviteten (dF/sec) ble målt ved 0, 0,5, 1, 2, 4, 6 og 18 timer etter surgjøring til pH 4,0 **A)** og **B)** (n=1-2). **A)** Legumainaktiviteten (dF/sec) av legumain fra DMSO-kontroll ble sammenlignet med tunikamycinbehandlede celler (1 og 5 µg/ml i 24 timer). **B)** Legumainaktiviteten (dF/sec) av legumain fra tunikamycinbehandlede celler, 5 µg/ml i 24 timer vs. 5 + 1 i totalt 48 og 72 timer. **C)** Uttrykk av autoaktivert prolegumain i kondisjonerte medier ble analysert ved hjelp av polyakrylamidgelelektroforese og immunoblotting. Dette ble analysert ved hjelp av et spesifikt antistoff for legumain. Brønn 1 representerer konsentrasjon 5 µg/ml i 24 timers behandling med tunikamycin, mens brønn 2 representerer konsentrasjon 5 + 1 µg/ml i totalt 72 timer. Dette blottet viser proteinbånd kun ved 0, 0,5, 1, 6 og 18 timer (n=1-2).

4.2.2 Autoaktivering av prolegumain i cellelysater

Autoaktivering av prolegumain i cellelysatene ble også undersøkt, og ble utført etter metode beskrevet i kapittel 3.6. Det var interessant å undersøke autoaktiveringen av prolegumain i cellelysatene i forhold til autoaktivering av prolegumain i cellemedium (kapittel 4.2.1).

I et tidsforsøk (0, 0,5, 1, 4, 6 og 18 timer) ble prolegumain i cellelysatene fra tunikamycinbehandlede celler og DMSO-kontrollen autoaktivert. Etter surgjøring til pH 4,0 (ved tid = 0 timer) ble cellelysatene inkubert ved 37 °C. Legumainaktiviteten (dF/sekund) i cellelysatene ble målt ved å bruke et spesifikt fluorescerende peptidsubstrat (Z-Ala-Ala-Asn-AMC), og resultatet ble korrigert for totalproteinkonsentrasjon. Prolegumain i cellelysatene fra DMSO-kontrollen ble autoaktivert, og etter allerede 0,5 time så legumainaktiviteten ut til å øke litt, for å så bli høyest mellom 2 og 6 timer. Det ble observert en betydelig reduksjon i legumainaktivitet etter 18 timer sammenlignet med starten av eksperimentet (tid = 0 timer) (Figur 4.6 A).

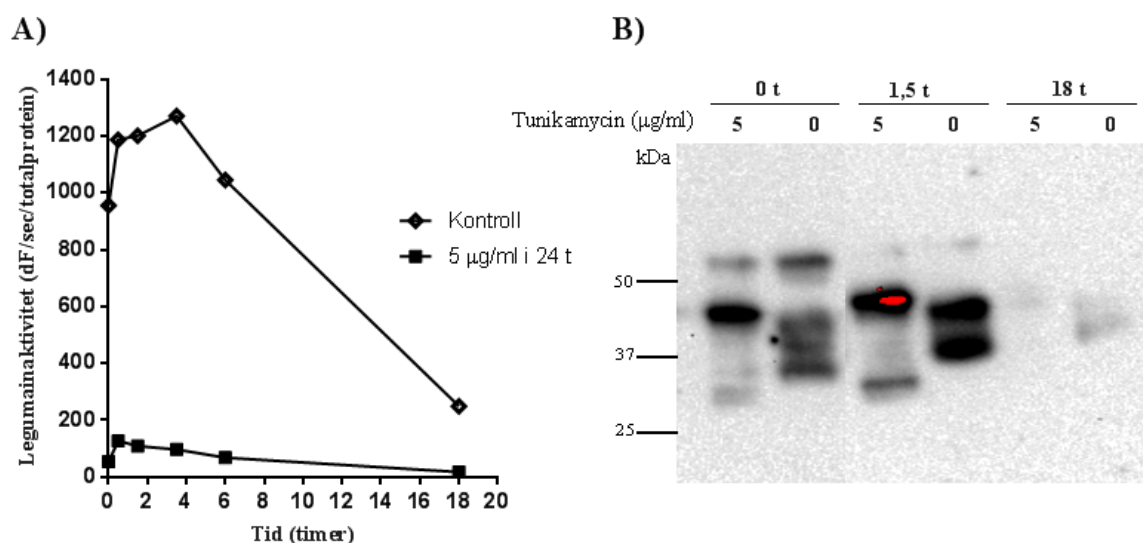
Resultatene fra cellelysatene indikerte at prolegumain ikke ble autoaktivert som følge av tunikamycinbehandling. Det ble ikke observert økning i legumainaktiviteten ved de ulike inkubasjonstidene.

Tilsvarende det som ble observert etter 18 timer i DMSO-kontrollen, ble også observert i tunikamycinbehandlede celler, legumainaktiviteten gikk ned etter 18 timer. Tunikamycinbehandling resulterte i nedgang i legumainaktivitet ved 0 timer sammenlignet med DMSO-kontrollen, tilsvarende tidligere observasjoner (Figur 4.6 A).

Immunoblotting av legumain i cellelysatene fra DMSO-kontrollen viste et proteinbånd ved 0 timer ved 56 kDa. Det ble observert en svak skygge som kan være proformen av legumain ved 0,5 time, men denne proformen av legumain var totalt fraværende etter 18 timer. Etter 1,5 time ble det detektert kun to ulike former av autoaktiverte prolegumain, den første så ut til å representere den intermediære, aktive formen av legumain (46 kDa), mens den andre så ut til å være den aktive, modne formen av legumain (36 kDa). Etter 18 timer ble det observert proteinbånd med veldig svak intensitet både ved tunikamycinbehandlede celler og DMSO-kontroll. I DMSO-kontroll ble det observert to former med veldig svak intensitet, og disse formene antas å være den intermediære, (glykosylerte) aktive formen (46 kDa) og den aktive,

modne formen (36 kDa). Proteinbåndet som ble observert fra tunikamycinbehandlede celler hadde enda lavere intensitet, og antas å være uglykosylert proform (47 kDa; Figur 4.6 B).

Prolegumain ved 56 kDa ble også observert ved 0 timer etter autoaktivering av prolegumain fra tunikamycinbehandlede celler. Den aktive modne formen av legumain (36 kDa) ble også observert ved 0 og 1,5 timer, men ved et mye svakere proteinbånd enn det som ble observert i DMSO-kontrollen. Intensiteten av proteinbåndet av denne aktive, modne formen (36 kDa) så ut til å være sterkest ved 1,5 time. Uglykosylert proform ble observert ved 47 kDa ved 0 og 1,5 timer, men så ut til å være borte ved 18 timer. Ved 0 timer ble det observert et svakt proteinbånd av den uglykosylerte formen ved 28 kDa. Dette båndet antas å være den aktive, modne formen av uglykosylert legumain. Det ble observert et sterkere proteinbånd av denne formen ved 1,5 time enn ved 0 timer. De andre formene som er mellom prolegumain og den aktive modne uglykosylerte form av legumain kan representere ulike grader av glykosylering. Det ble ikke observert noe proteinbånd ved 18 timer (Figur 4.6 B).



Figur 4.6: Legumainaktivitet (A) og immunoblott (B) fra cellelysate fra tunikamycinbehandlede- og kontroll-M38L-celler ved ulike tider (0, 0,5, 1,5, 3,5, 6 og 18 timer(t)). M38Lceller ($5,0 \times 10^6$ celler/flaske) ble behandlet med 5 µg/ml tunikamycin i 24 timer og sammenlignet med kontroll (5 µl DMSO). Prolegumain fra cellelysate ble autoaktivert ved å endre pH i cellelysate fra nøytral til 4,0 før inkubering ved 37 °C i 0, 0,5, 1, 0,5, 3,5, 6 og 18 timer. **A)** Legumainaktiviteten (dF/sec) i cellelysate ble målt ved å bruke et spesifikt fluorescerende peptidsubstrat (Z-Ala-Ala-Asn-AMC) og ble korrigert for den totale proteinkonsentrasjonen (dF/sec/totalprotein) (n=1-2). **B)** Uttrykk av legumain i cellelysate ble analysert ved hjelp av polyakrylamidgelelektroforese og immunoblotting og et spesifikt antistoff rettet mot legumain. Dette er blottet, viser proteinbånd kun ved tiden 0, 1,5 og 18 timer (n=1-2).

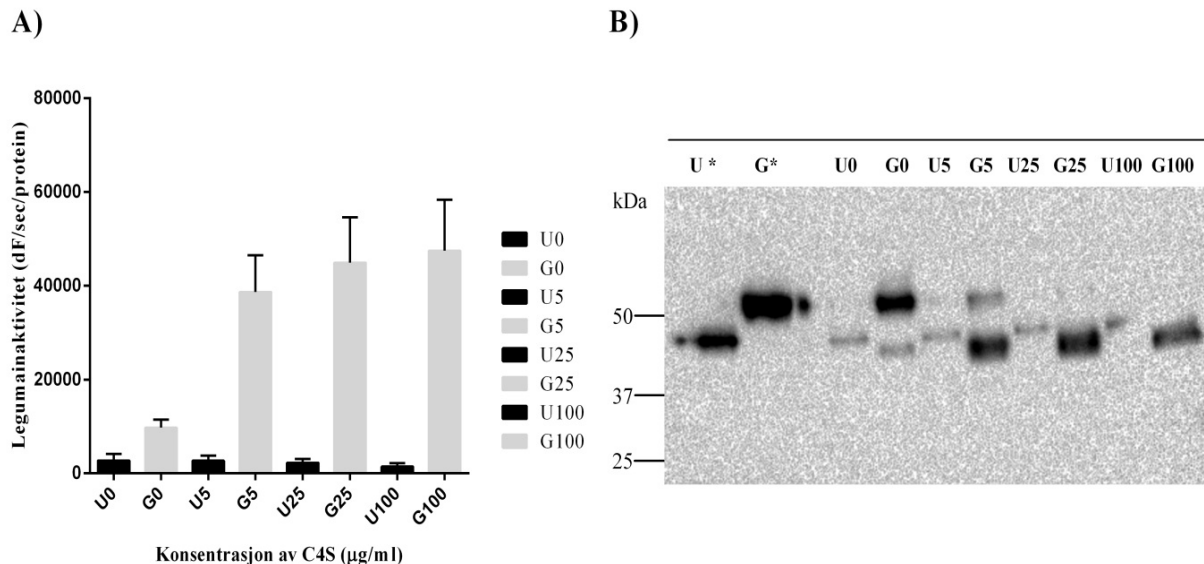
4.3 Effekt av glykosaminoglykaner på autoaktivering av prolegumain

For å studere effekten av glykosaminoglykaner på autoaktivering av prolegumain, sammenlignet vi kondisjonerte medier fra M38L-celler som ble behandlet med 5 µg/ml tunikamycin i 24 timer, og deretter 1 µg/ml tunikamycin opp til 72 timer, med DMSO-kontrollen (24 timer). Glykosaminoglykanene som ble benyttet i denne oppgaven var C4S og HS. Effekten av C4S og HS på autoaktivering av prolegumain fra tunikamycinbehandlede celler og DMSO-kontrollen ble undersøkt ved å endre pH i medium fra nøytral til sur (4,0). Etter pH-endring ble ulike konsentrasjoner av C4S eller HS (0, 5, 25, 100 µg/ml) tilsatt til både det kondisjonerte mediet fra tunikamycinbehandlede celler og DMSO-kontrollen. Etter fire timers (tre timer for et forsøk med C4S) inkubasjon i 37 °C ved pH 4,0 ble legumainaktiviteten (dF/sec) målt, og resultatene analysert ved elektroforese. I tillegg ble to elektroforeseprøver av det kondisjonerte mediet fra tunikamycinbehandlede celler og DMSO-kontrollen (ikke autoaktiverte) medium uten tilsatt C4S eller HS (U* og G*) analysert på samme måte. GAGs-kontroll (G0/U0) ble verken behandlet med C4S eller HS, og ble brukt som kontroll mot prøver som ble behandlet med HS eller C4S.

4.3.1 Kondroitin-4-sulfat (C4S) akselererte autoaktivering av glykosylert prolegumain

Det ble observert ca. 4 ganger økning i legumainaktiviteten (dF/sec) av autoaktivert glykosylert prolegumain ved konsentrasjon 5, 25 og 100 µg/ml av C4S sammenlignet med GAGs-kontroll (G0). Resultatene kan indikere en forskjell mellom de ulike konsentrasjonene (5, 25 og 100 µg/ml) av C4S, men denne forskjellen er ikke signifikant (Figur 4.7 A, grå kolonner).

Videre ble det ikke observert signifikant forskjell i legumainaktiviteten (dF/sec) av uglykosylert legumain i kondisjonert medium fra de tunikamycinbehandlede cellene (U5, U25, U100) sammenlignet med GAGs-kontrollen (U0). Ved å sammenligne U0 med G0, ble det ikke observert en signifikant forskjell i legumainaktiviteten (Figur 4.7 A, svarte kolonner).



Figur 4.7: Kondroitin-4-sulfat (C4S) akselererte autoaktiveringen av prolegumain på en konsentrasjonsavhengig måte. Prolegumain (i kondisjonert medium fra tunikamycinbehandlede M38L-celler (uglykosylert prolegumain, U) eller kontrollceller (glykosylert prolegumain, G) ble inkubert ved pH 4,0 i 4 timer (et forsøk i 3 timer) ved 37 °C med og uten tilstedeværelse av C4S (0, 5, 25 og 100 µg/ml). **A)** Legumainaktiviteten (dF/sec) ble målt ved hjelp av et spesifikt fluorescerende peptidsubstrat (Z-Ala-Ala-Asn-AMC) (n=5). **B)** Prøvene for immunoblotting ble utført etter metoden som er beskrevet i kapittel 3.7. U* og G* representerer uglykosylert og glykosylert form av prolegumain fra kondisjonerte medier av tunikamycinbehandlede celler (U*) og kontrollceller (G*) før pH ble endret fra nøytral til 4,0. Et representativt blott (n=5) er vist, og blottet ble analysert ved hjelp av et spesifikt antistoff for legumain.

Immunoblotting av kondisjonerte medier fra DMSO-kontrollen og tunikamycinbehandlede celler uten tilstedeværelse av C4S viste to sterke proteinbånd med størrelse 56 og 47 kDa (G* og U*). Dette representerte henholdsvis glykosylert (G*) og uglykosylert (U*) proform av legumain og viste mer prolegumain i prøvene før pH-endring fra nøytral til pH 4,0 (Figur 4.8 B).

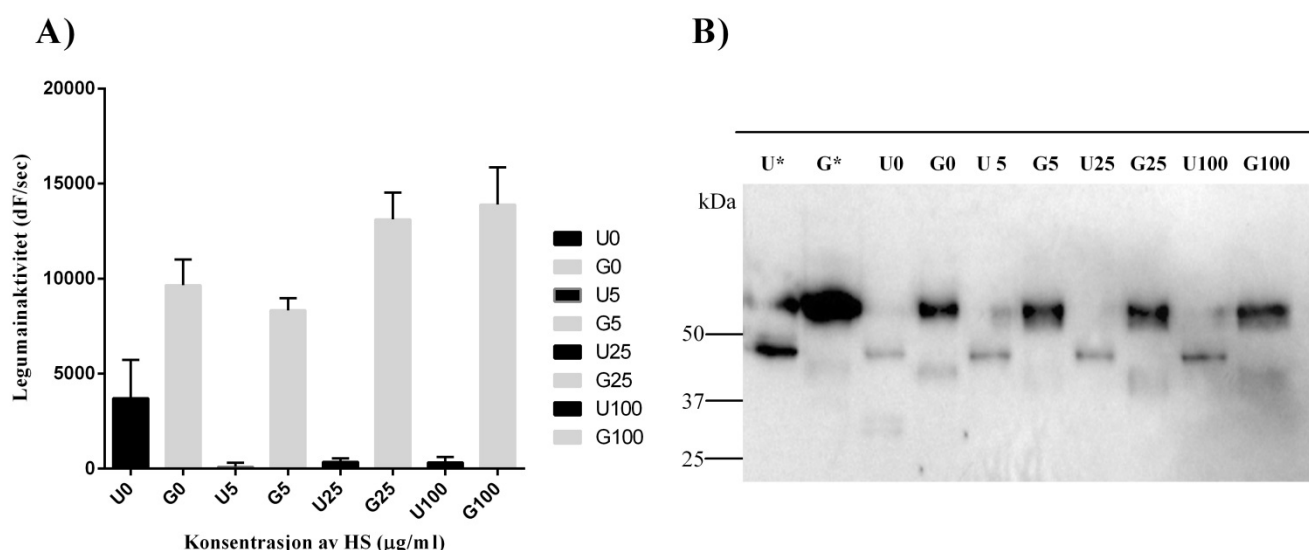
Ved pH 4,0 ble glykosylert (G) proform (56 kDa) observert etter behandling med 5 µg/ml C4S (G5). Den glykosylerte proformen ble borte etter hvert som konsentrasjonen av C4S økte, og var totalt fraværende ved konsentrasjon 100 µg/ml (G100). I tillegg ble den aktive, intermediære formen (46 kDa) av autoaktivert, glykosylert prolegumain påvist ved konsentrasjonene 5, 25 og 100 µg/ml C4S. Dette bekrefter at proformen var fullstendig omdannet til den aktive, intermediære formen av glykosylert legumain (46 kDa), sammenlignet med legumainaktiviteten (Figur 4.7 A).

Til forskjell ble det påvist et svakt proteinbånd av uglykosylert proform av legumain ved 47 kDa i GAGs-kontroll (U0). Etter behandling med C4S (5, 25 og 100 µg/ml) ble det også

observert et svakt proteinbånd på 47 kDa av uglykosylert proform av legumain (U5, U25 og U100) og den aktive, intermediære formen av legumain ble ikke observert i disse prøvene eller i GAGs-kontrollen (U0) (Figur 4.7 B).

4.3.2 Effekt av heparansulfat (HS) på autoaktivering av prolegumain

Det ble ikke observert signifikant forskjell i legumainaktiviteten (dF/sec) av glykosylert prolegumain etter behandling med ulike konsentrasjoner (0, 5, 25 og 100 µg/ml) av HS. Likevel kan det se ut som de høyeste konsentrasjonene (25 og 100 µg/ml) av HS (G25 og G100) ga tendens til økt legumainaktivitet sammenlignet med GAGs-kontrollen (G0) (Figur 4.8 A, grå kolonner).



Figur 4.8: Effekt av heparansulfat (HS) på autoaktivering av prolegumain. Prolegumain (fra M38L-celler) ble inkubert i 4 timer ved 37 °C med og uten HS (0, 5, 25 og 100 µg/ml) tilsatt kondisjonerte medier fra tunikamycinbehandlede celler og kontrollceller. A) Legumainaktiviteten (dF/sec) ble målt ved hjelp av et spesifikt fluorescerende peptidsubstrat (Z-Ala-Ala-Asn-AMC) (n=3). B) Prøvene for immunoblotting ble tatt etter 4 timer etter metoden som er beskrevet i kapittel 3.7. U* og G* representerer uglykosylert og glykosylert form av prolegumain fra kondisjonerte medier av tunikamycinbehandlede celler (U*) og kontrollceller (G*) før pH ble endret fra nøytral til 4,0. Et representativt blott fra n=3, blottet ble analysert ved hjelp av et spesifikt antistoff for legumain.

Tilsvarende for medium fra tunikamycinbehandlede celler ble det ikke observert signifikant forskjell i legumainaktiviteten (dF/sec) av uglykosylert legumain (U5, U25 og U100) sammenlignet med GAGs-kontrollen (U0). I tillegg viste legumainaktiviteten av den uglykosylerte legumainformen seg å være svært lav ved alle konsentrasjonene av HS (G5, G25, G100). Ved å sammenligne G0 og U0 ble det observert 66 % forskjell mellom dem (Figur 4.8 A).

Ved immunoblotting ble det påvist mye prolegumain før pH-endring fra nøytral til pH 4,0 av de kondisjonerte mediene fra DMSO-kontrollen (G*) og tunikamycinbehandlede (U*) celler (Figur 4.8 B), som representerte henholdsvis glykosylert (56 kDa) og uglykosylert (47 kDa) prolegumain. Den glykosylerte proformen (56 kDa) av legumain ble observert etter inkubering med alle konsentrasjonene av HS. I tillegg ble to svake proteinbånd observert ved 46 kDa etter inkubering med konsentrasjonene G0, G25 og G100 µg/ml av HS og viste at prolegumain (56 kDa) var delvis omdannet til den aktive intermediære formen av legumain (46 kDa) (Figur 4.8 B).

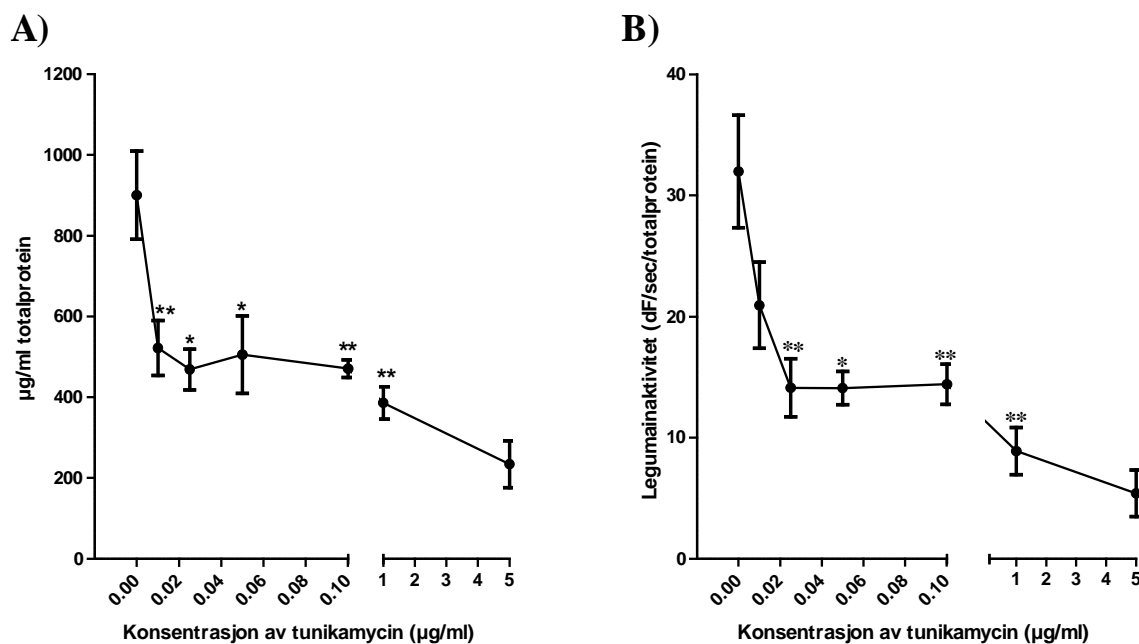
Ved pH 4,0 ble det påvist et svakt proteinbånd av den uglykosylerte proformen ved 47 kDa, og to andre svake proteinbånd ble observert (U0). Molekylvekten til disse to proteinbåndene ble ved hjelp av programmet Image Lab® versjon 5.2.1 beregnet til omtrent 31 og 32 kDa. Dette viste delvis omdannelse av den uglykosylerte proformen til de aktive, intermediære formene av uglykosylert legumain i GAGs-kontrollen. Uglykosylert proform (47 kDa) av legumain ble observert etter inkubering i 4 timer med alle konsentrasjonene (5, 25 og 100 µg/ml) av HS, men ytterligere dannelse av aktiv intermediær form av legumain ble ikke observert (Figur 4.8 B).

4.4 Tunikamycin reduserte legumainaktiviteten og totalproteinkonsentrasjonen i HCT116-cellelysater

Tunicamycineffekten ble videre undersøkt på HCT116-celler. Ved å behandle disse cellene med tunikamycin ønsket vi å oppnå uglykosylerte former av legumain. Lignende morfologiske endringer etter 48 timer ble observert i HCT116 celler som i M38L-celler etter behandling med tunikamycin.

HCT116-celler ($5,0 \times 10^5$) ble stimulert med ulike konsentrasjoner (0, 0,01, 0,025, 0,05 0,1, 1 og 5 µg/ml) av tunikamycin i 48 timer før høsting. Deretter ble totalproteinkonsentrasjon (Figur 4.9 A) og legumainaktivitet (Figur 4.9 B) i cellelysatene målt. Det ble observert en signifikant reduksjon (55 %) i totalproteinkonsentrasjon i cellelysatene etter behandling med tunikamycin ved 0,01 til 1 µg/ml. I tillegg så det ut som at 5 µg/ml tunikamycin resulterte i en tendens til ytterligere reduksjon (22 %) av den totale proteinkonsentrasjonen (Figur 4.9 A). Legumainaktiviteten (dF/sekund) i cellelysatene ble korrigert for totalproteinkonsentrasjon. Det ble observert en nedgang i legumainaktiviteten i cellelysatene

etter behandling med tunicamycin. Konsentrasjoner av tunicamycin fra 0,025 til 1 $\mu\text{g/ml}$ førte med seg en signifikant reduksjon (50 %) av legumainaktivitet sammenlignet med DMSO-kontrollen. I tillegg så det ut som konsentrasjonen 5 $\mu\text{g/ml}$ hadde en tendens til reduksjon på ca. 85 % av den opprinnelige legumainaktiviteten (Figur 4.9 B).



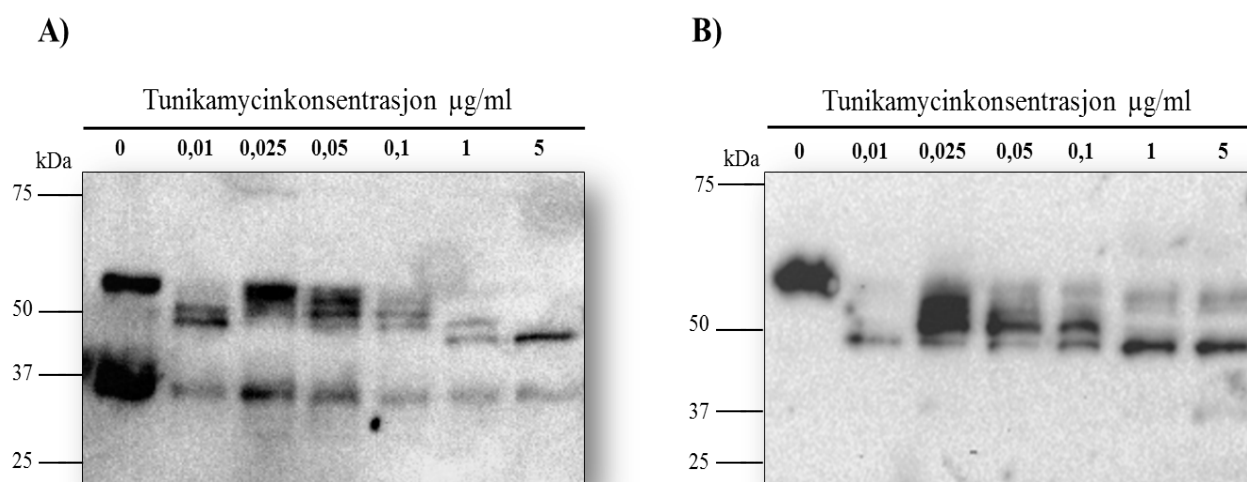
Figur 4.9: Totalproteinkonsentrasjon (A) og legumainaktivitet (B) i HCT116-celler etter 48 timers behandling med tunicamycin. HCT116-celler ($5,0 \times 10^5$ celler/brønn) ble behandlet med ulike konsentrasjoner av tunicamycin (0, 0,01, 0,025, 0,05, 0,1, 1 og 5 $\mu\text{g/ml}$) og inkubert i 48 timer ved 37 °C. Kontrollen er 5 μl DMSO. **A)** Totalproteinkonsentrasjon ($\mu\text{g/ml}$) i cellelysater etter behandling med tunicamycin (n=2-4; *p<0,05 vs. DMSO-kontroll), pare t-test). **B)** Legumainaktiviteten (dF/sec) ble målt ved å bruke et spesifikt, fluorescerende peptidsubstrat (Z-Ala-Ala-Asn-AMC) og ble korrigert for den totale proteinkonsentrasjonen (dF/sec/totalprotein) (n=2-4; *p<0,05, og **p<0,01 vs. DMSO-kontroll, pare t-test).

4.4.1 Økt prolegumain i cellelysater og kondisjonert medium fra tunicamycin-behandlede HCT116-celler

Immunoblotting av cellelysater fra HCT116-kontrollcellene (DMSO-kontroll) viste at disse inneholdt både glykosylert proform (56 kDa) og aktiv form (36 kDa) av legumain (Figur 4.10 A). Den aktive formen av legumain så ut til å reduseres med økende konsentrasjon av tunicamycin. Behandling med økende konsentrasjoner av tunicamycin førte til at proformen på 56 kDa gradvis forsvant og ble erstattet av lavere molekylvektformer. Totalt ble 4 ulike former av prolegumain detektert, og det antas at dette representerer ulik grad av

glykosylering. Ved inkubering med 5 µg/ml tunikamycin ble det observert i hovedsak én prolegumainform med molekylvekt 47 kDa og kun spor av aktiv form på 36 kDa.

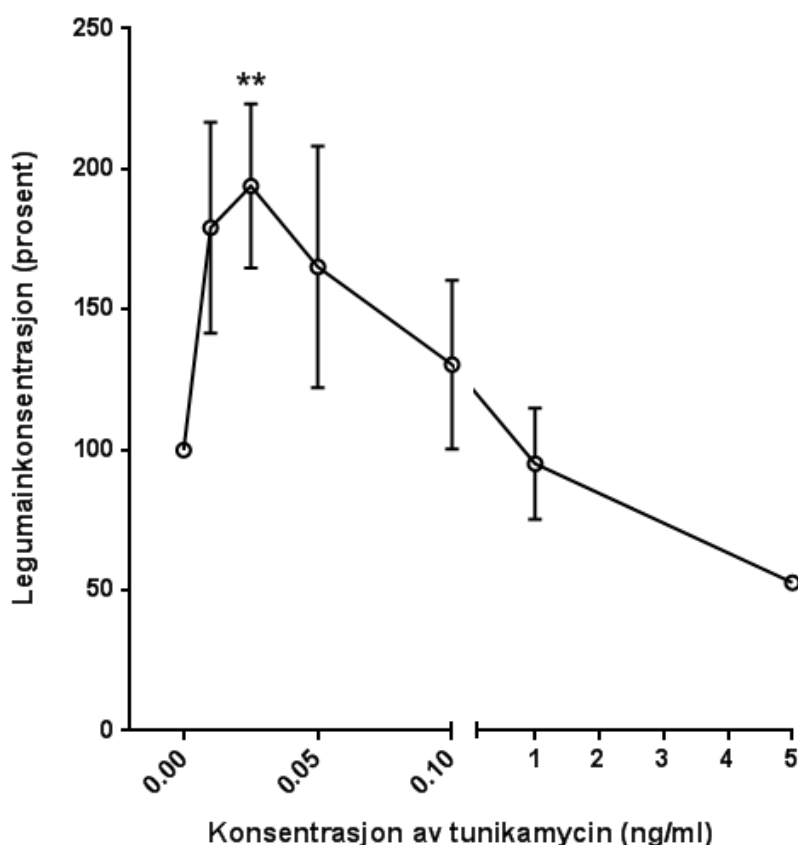
Immunoblotting av de kondisjonerte mediene viste et sterkt proteinbånd av glykosylert prolegumain (56 kDa) i DMSO-kontrollen (Figur 4.10 B). I tunikamycinbehandlede celler (1 og 5 µg/ml), var dette båndet hovedsakelig erstattet av et proteinbånd på 47 kDa. I likhet med det som ble observert i cellelysaten ble det også påvist flere bånd fra legumainformer med forskjellig molekylvekt ved de ulike konsentrasjonene av tunikamycin. Det ble observert flest bånd for prøvene fra cellene som ble behandlet med de laveste konsentrasjonene (0,01 til 0,1 µg/ml) av tunikamycin. Høyere konsentrasjoner (1 og 5 µg/ml) av tunikamycin kan ha større evne til å hemme glykosylering enn lavere konsentrasjoner. Resultatene kan indikere at effekten ikke var forskjellig mellom konsentrasjonene 1 og 5 µg/ml.



Figur 4.10: Effekten av tunikamycin på molekylvekten av legumain. HCT116-cellene ($5,0 \times 10^5$ celler/brønn) ble behandlet med ulike konsentrasjoner (0, 0,01, 0,025, 0,05, 0,1, 1 og 5 µg/ml) av tunikamycin i 48 timer. Kontrollcellene ble behandlet med 5 µl DMSO. Uttrykk av legumain i cellelysaten (A) og de kondisjonerte mediene (B) ble analysert ved hjelp av polyakrylamidgelelektroforese og immunoblotting. Dette ble analysert ved hjelp av et spesifikt antistoff for legumain. A) I hver brønn ble det applisert 2,46 µg totalprotein ved gelelektroforese av cellelysater (n= 2). B) Mediene ble oppkonsentrert ved å felle 350 µl medium med aceton og løse pellet i 20 µl prøvebuffer, og 15 µl ble applisert i hver brønn (n= 2).

4.4.2 Tunikamycin-behandling fører til økt sekresjon av legumain

For å undersøke om glykosylering påvirker sekresjonen av legumain fra HCT116-celler ble disse ($5,0 \times 10^5$ celler/brønn) inkubert i 48 timer med og uten tunikamycin (0, 0,01, 0,025, 0,05, 0,1, 1 og 5 $\mu\text{g/ml}$). Konsentrasjonsbestemmelse av legumain i mediene ble gjort med en kommersiell ELISA-metode. Resultatene viste at konsentrasjon 0,025 $\mu\text{g/ml}$ av tunikamycin signifikant økte (2 gangers økning) sekresjonen av legumain, mens 5 $\mu\text{g/ml}$ reduserte sekresjonen av legumain med 53 % sammenlignet med DMSO-kontrollen (Figur 4.11).



Figur 4.11: Effekt av tunikamycin på sekresjon av legumain. Effekten av tunikamycin (0, 0,01, 0,025, 0,05, 0,1, 1 og 5 $\mu\text{g/ml}$) på sekresjonen av legumain fra HCT116-celler ($5,0 \times 10^5$ celler/brønn) ble målt i kondisjonert medium ved hjelp av en ELISA-metode etter 48 timers behandling. Legumainkonsentrasjonen er vist i prosent (%) av medier fra celler uten tunikamycin ($n=2-5$; ** $p < 0,01$ vs. DMSO-kontroll, parett t-test.)

5 Diskusjon

Legumain er en lysosomal cysteinprotease som har vist seg å være overuttrykt i flere krefttyper, blant annet bryst- [67], tykktarm- [15, 16, 67, 84], og prostatakraft [67, 70]. Celler som overuttrykker legumain er korrelert med mer metastaserende og invasive egenskaper [71]. Metastase er en stor utfordring i kreftbehandling, og er en viktig årsak til kreftdødsfall [64, 65]. Cysteinproteaser antas å være lovende kandidater i forbindelse med utvikling av spesifikke prodrugs rettet mot kreftceller [67].

Den foreliggende studien ble igangsatt for å studere viktigheten av glykosylering for sekresjonen av legumain, samt autoaktiveringen av glykosylert og uglykosylert prolegumain, og hvordan GAGs påvirker dette. Tidligere studier viser at glykosylering og fosforylering spiller en viktig rolle i cellulær transport og funksjon av proteiner [26].

I denne studien har resultatene vist at glykosylering av legumain er nødvendig både for modning, transport og sekresjon av legumain. Dette er interessant da det tidligere ble vist av masterstudenten Ingrid Damgaard at glykosylering av legumain er viktig for prosessering og intracellulær transport til kjernen, i motsetning til fosforylering som ikke så ut til å være viktig for prosessering av legumain [32]. På bakgrunn av dette funnet ble det valgt å videre studere betydningen av glykosylering av legumain. I tillegg ble sekresjonen av legumain studert etter behandling med ulike konsentrasjoner av tunikamycin, en hemmer av N-koblet glykosylering. Effekten av glykosaminoglykaner (GAGs) på autoaktivering av prolegumain (glykosylert og uglykosylert) ble også studert i denne oppgaven. På grunn av tids- og arbeidsbegrensninger, ble kun C4S og HS brukt. Selv om ulike GAGs tidligere har vist å akselerere autoaktivering av glykosylert prolegumain [43], så viste denne studien at C4S og HS ikke akselererer autoaktivering av uglykosylerte prolegumain på samme måte.

5.1 Valg av cellemodeller

I denne studien ble to ulike cellelinjer valgt, en monoklonal legumaintransfektet HEK293-cellelinje som overuttrykker legumain (M38L), og en cellelinje fra kolorektalkreft (HCT116). HEK293-celler er lette å vedlikeholde, har rask vekst og har evnen til å produsere modne og funksjonelle proteiner, noe som gjør den til en attraktiv cellelinje til bruk i forskning [85].

M38L-celler ble derfor valgt for å studere aktivitet, sekresjon og proteinuttrykk av legumain, samt autoaktivering av sekreert prolegumain. Evnen til å uttrykke mye legumain gjør det mulig og lettere å se endringene i aktivitet og uttrykk av legumain i denne cellelinjen. HCT116 er en kommersiell kolorektalkreft cellelinje som har høyt uttrykk av den aktive formen av legumain (36 kDa), og skiller ut proformen (56 kDa) i (kondisjonert medium) [15]. I motsetning til M38L er det lite prolegumain i kondisjonerte medier fra HCT116-celler, noe som kan føre til at det ikke blir autoaktivert *in vitro* (et forsøk ble utført på kondisjonerte medier, men er ikke vist i denne oppgaven). Begge celletypene ble benyttet videre for å studere sekresjon, aktivitet og proteinuttrykk av legumain, med og uten tunikamycinbehandling. Det ble brukt cellelinjer, og ikke primære cellekulturer i denne studien, ettersom cellelinjer er bedre egnet til langvarig dyrkning i kultur. Dette er svært gunstig i forsøkssammenheng. M38L-celler ble brukt som modellceller i innledende forsøk, mens HCT116-celler ble benyttet som kreftcellemodell.

5.1.1 Valg av tunikamycin som hemmer av N-koblet glykosylering

N-koblet glykosylering er en kompleks prosess som involverer flere trinn. Det er mange ulike faktorer som kan tas i betraktning for variasjoner i graden av glykosylering *in vivo*, blant annet tilstedeværelsen og spesifisiteten av transferaser [28]. I denne studien ble tunikamycin benyttet, som et effektivt verktøy for å studere tilstedeværelsen eller rollen av N-koblet oligosakkarider [35] i legumain. Fordelen ved å bruke tunikamycin er på grunn av sin spesifisitet mot en felles kjernestruktur som forekommer i alle N-koblede glykaner. I tillegg var det ønskelig å hemme glykosylering av prolegumain fullstendig, og ikke bruke forbindelser som kan forårsake forandringer i strukturen av karbohydratkjeden [35, 37]. Konsentrasjonen av tunikamycin som er beskrevet i litteraturen for å hindre glykosylering varierer mellom 0,1-10 µg/ml [35]. Konsentrasjonen av tunikamycin som kan bli brukt er begrenset av medfølgende toksisiteten, og respons på behandling kan variere mellom ulike cellelinjer [35]. Derfor var det behov for etablering av optimal konsentrasjon for hver enkelt cellelinje. I forbindelse med dette studiet ble HCT116- og M38L-cellelinjer eksponert for ulike konsentrasjoner av tunikamycin. Innledende ble kun konsentrasjonene 1 og 5 µg/ml benyttet på M38L-celler, og dette så ut til å være optimale konsentrasjoner for å hemme legumainglykosylering. Videre ble lavere konsentrasjoner (0,01, 0,025, 0,05 og 0,1 µg/ml) av tunikamycin også testet, for å undersøke om disse konsentrasjonene hadde like god hemmende effekt som 1 og 5 µg/ml. Tunikamycinkonsentrasjonene ≤ 1 µg/ml ble testet kun

på HCT116-celler på grunn av begrenset tid. Disse konsentrasjonene ble valgt på bakgrunn av interessen for å undersøke doseresponseeffekt av tunikamycin ved ulike konsentrasjoner, og den høyeste konsentrasjonen på 5 µg/ml ble valgt på bakgrunn av effekten på legumainglykosylering som ble observert av Ingrid Damgaard [32].

5.2 Effekten av tunikamycin på proteinuttrykk og aktivitet av legumain

Det ble identifisert to molekulære former av legumain i HCT116-cellelysater etter behandling med tunikamycin. Disse formene ble identifisert som uglykosylert proform (47 kDa) og glykosylert, moden, aktiv form (36 kDa). Tilsvarende former ble identifisert i en tidligere studie [32]. Den uglykosylerte aktive modne formen av legumain (28 kDa) ble ikke detektert i HCT116-celler i noen av disse studiene, og en tidligere hypotese har foreslått at dette skyldes varigheten av eksponeringstiden av tunikamycin. Ettersom den aktive, uglykosylerte formen ikke ble detektert etter 24 timer ble behandlingstiden utvidet til 48 timer, men det var fremdeles ingen indikasjon av den aktive, uglykosylerte formen [32]. Ytterligere økning av behandlingstid over 48 timer er ikke ønskelig, da det er antatt at det vil forårsake en rekke uønskede cellulære prosesser slik som cellesyklusarrestasjon og apoptose [35, 41]. I denne studien ble M38L-celler utsatt for en behandlingstid på 72 timer, noe som førte til ytterligere celledød sammenlignet med 48 timer.

En viktig ting å legge merke til er at rett etter at cellene har blitt stimulert med tunikamycin vil det både være glykosylerte og uglykosylerte proteiner i cellene. Det vil derfor ta tid før alle glykosylerte proteiner er degradert (avhengig av halveringstid), og til alle proteinene vil være av uglykosylert type. I en tidligere studie ble det foreslått behandlingstid på 24 timer [40]. Denne tiden vil tillate en celle å erstatte de fleste av sine endogene glykoproteiner med proteiner uten oligosakkarider som er syntetisert under tilstedeværelse av tunikamycin. Likevel kan inkubasjonstiden variere avhengig av både hastigheten på metabolismen og av ny-syntesen av proteiner [40]. I tillegg, for å oppnå den aktive modne formen av legumain kreves det flere prosesseringstrinn av prolegumain (inaktiv) [8].

I motsetning til HCT116, så ble et svakt proteinbånd på 28 kDa observert i M38L-cellelysater. Denne formen antas å være den aktive, modne, uglykosylerte formen av

legumain og ble kun detektert etter 24 timers behandling med tunikamycin, men ikke etter 48 eller 72 timer. En viktig forskjell mellom disse to celletypene, er at en M38L-celle er en modifisert celletype som overuttrykker legumain, og produserer mer prolegumain enn HCT116-cellene. Man kan spekulere i at til tross for mangel på glykosylering så vil allikevel noe prolegumain bli aktivert, men det vil gå mye saktere, og denne aktiviteten kan kun detekteres når mengden av prolegumain er høy nok. Det kan også skyldes at den aktive, uglykosylerte, formen er mer ustabil enn den glykosylerte, slik at den uglykosylerte, modne formen (28 kDa) forsvinner fort på grunn av redusert halveringstid. Tidligere studier har vist at glykosylering påvirker halveringstiden og omsetningen av proteiner, noe som kan relateres til deres stabilitet i cellene [86]. Det at den uglykosylerte, aktive, modne formen forsvinner fort, observert ved svak båndintensiteten på immunoblott, kan forklares ved at den har lavere halveringstid enn den glykosylerte formen av legumain. I tillegg er det funnet at prolegumain er mer stabil enn den modne, aktive, formen av legumain som har en monomerstruktur, mens prolegumain antas å være mer stabil på grunn av sin homodimerstruktur [18].

Det er også viktig å ta med i betraktning at når cellene behandles med tunikamycin så påvirkes alle proteiner som normalt glykosyleres. Det antas at legumain trenger andre proteaser for å bli aktivert [8], og det kan tenkes at disse ikke lenger er aktive på grunn av tunikamycinbehandlingen av HCT116-cellene. Til forskjell kan det være at disse proteasene ikke påvirkes på samme måte i M38L-celler. I tillegg kan det være andre proteaser, som ikke er avhengig av glykosylering og kun uttrykkes i M38L-celler (ikke HCT116), som har evne til å aktivere legumain. En tidligere studie har vist at endring av N-koblet glykosylering kan resultere i fullstendig tap av bestemte funksjoner [86]. Likevel, endring av glykosylering varierer mye mellom proteiner, og noen kan være aktive til tross for fjerning av glykosylering. Det er viktig å merke seg at samme modifikasjon i glykosylering kan ha en dramatisk motsatt effekt *in vivo* sammenlignet med *in vitro*. Eksempel på dette er glykoprotein-hormonene, humant chorion-gonadotropin (HCG) og luteiniserende hormon (LH), hvor endring av glykosylering forårsaker endring i deres spesifisitet, affinitet, og intracellulær signalering *in vitro*, mens effekter *in vivo* er forskjellig på grunn av endret "clearance" [86].

Manglende legumainprosessering i HCT116-celler er tidligere evaluert gjennom to ulike hypoteser [32]. Den første hypotesen (1) er endret cellulær transport, hvor uglykosylert

prolegumain ikke transporteres til lysosomene; den andre (2) er at legumain transporteres til lysosomene, men ikke prosesseres til moden form når den er uglykosylert. I denne studien ble det observert sekreert prolegumain, noe som kan skyldes endret cellulær transport, men ytterligere analyser er nødvendig for å konkludere om dette er tilfellet. Hypotese (2) kan samsvare med det som ble funnet i HCT116-celler ettersom den aktive formen ikke ble observert, men det samsvarer ikke med det som ble funnet i M38L-celler. Disse resultatene kan lede oss til nye hypoteser, slik som at det kan finnes andre proteaser som kan bidra til denne prosessering av den aktive, uglykosylerte formen som finnes i M38L-celler, men ikke i HCT116-celler.

Samsvarende med hypotese (1) om endret cellulær transport, har flere studier foreslått at glykosylering er viktig i regulering av proteintransport. Et velkarakterisert viralt glykoprotein, hemagglutinin, er et eksempel som viser at glykosylering er viktig for reguleringen av transport ut av rER [87, 88]. Andre studier har vist at glykoproteiner kan bli transportert ut av rER uten å bli glykosylert. For eksempel er fibronectin normalt glykosylert, men glykosylering viser seg å ikke være nødvendig for sekresjon eller biologisk aktivitet [87, 89]. Den dominerende teorien for intracellulær transport av legumain etter proteinsyntesen er via Golgi-apparatet og videre til lysosomer via endosomer [90]. Det er antatt at glykosylering er viktig for transport til lysosomer, som også er hovedstedet hvor den inaktive prolegumain blir prosessert til den aktive formen av legumain [90-92]. Lokalisering av legumain er ikke begrenset til lysosomer, og har blitt observert ekstracellulært og i kjernen [15, 67]. Som observert i HCT116 totalcellelysater er utskilt og kjernelokalisert legumain vist å være glykosylert (Haugen *et al.* upubliserte data, Tumorbiologisk avdeling, Radiumhospitalet, Oslo universitetssykehus) [32]. Legumain er avhengig av flere prosesser for å nå sin modne form, og det er antatt at lysosomale proteaser tar del i modningsprosessen [8]. Det ble derfor spekulert i at proteaser kun gjenkjenner og aktiverer den glykosylerte formen av prolegumain [32]. Denne hypotesen kan stemme med de resultatene som ble funnet i HCT116-celler, men likevel inneholdt tunikamycinbehandlede M38L-cellelysater den aktive modne formen av legumain.

Det ble observert en blanding av både uglykosylert og glykosylert legumain i tunikamycinbehandlede celler, og også andre former av legumain som antas å være delvis glykosylerte former. Ved å skifte mediet x timer etter tunikamycinbehandling ble ikke den glykosylerte formen lenger observert, og det så ut som kun den uglykosylerte formen ble

dannet. I tillegg ble det observert flere former for legumain ved lavere konsentrasjoner av tunikamycin enn $< 1 \mu\text{g/ml}$. Dette kan bety at det dannes flere former av legumain med ulik grad av glykosylering ved disse konsentrasjonene sammenlignet med høyere konsentrasjoner av tunikamycin (1 og $5 \mu\text{g/ml}$).

Legumainaktiviteten har tidligere vist seg å være avhengig av sur pH, men om den er avhengig av N-koblet glykosylering har til nå vært ukjent. Derfor ble legumainaktiviteten studert etter tunikamycinbehandling av celler med ulik eksponeringstid og konsentrasjoner. Resultatene viste at tunikamycin hadde en tendens til å redusere legumainaktiviteten etter 24 timers behandling og det så ut som at legumainaktiviteten ble redusert ytterligere etter 48 og 72 timer. Dette indikerer at glykosylering kan spille en viktig rolle for aktiviteten av legumain. Det er tidligere vist at graden av glykosylering varierer mye mellom proteiner [86]. For noen proteiner vil tap av glykosylering forårsake tap av aktivitet (for eksempel lysosomal β -glukosidase), mens andre får økt aktivitet ved redusert grad av glykosylering (for eksempel interleukin-4) [86]. I tilfellet med legumain, ser det ut som hemming av glykosylering reduserer aktiviteten av dette enzymet. Dessuten er noen glykoproteiner mer sensitive for endring i strukturen eller fjerning av oligosakkariddelen enn andre proteiner på grunn av molekylstørrelse og graden av glykosylering. For eksempel vil den opprinnelige konformasjonsstrukturen av store, glykosylerte proteiner kunne bli mer drastisk endret enn mindre glykosylerte proteiner [93].

Videre ble det observert nedgang i den totale proteinkonsentrasjonen etter tunikamycinbehandling. Den største reduksjonen i den totale proteinkonsentrasjonen ble observert etter 72 timers eksponering for tunikamycin, men uten særlig forskjell mellom konsentrasjonene 1 og $5 \mu\text{g/ml}$ de siste 48 timene. Den reduserte totale proteinkonsentrasjonen kan skyldes at noen celler er døde eller har løsnet. Siden DMSO-kontroll etter 72 timer ikke viste så mye reduksjon i den totale proteinkonsentrasjonen, indikerer dette at nedgang i den totale proteinkonsentrasjon er en effekt av tunikamycin og ikke løsningsmidlet DMSO. Tidligere har det blitt påvist at tunikamycin kan hemme proteinsyntesen *in vitro* ved å blokkere cellene i fase G1 av cellyklusen [35, 41]. Uglykosylerte former av legumain som dannes etter behandling med tunikamycin kan bli mer utsatt for degradering ettersom det antas at glykosylering beskytter mot cellulær proteolyse [86].

I en studie med embryoniske muskelceller behandlet med tunikamycin ble det påvist at glykosylering er nødvendig for stabilisering mot proteolytisk degradering [93]. Videre ble det funnet at uglykosylert protein ble degradert 5-10 ganger fortere enn glykosylert protein av intracellulære proteaser [94]. Det er også vist at glykosylering kan være nødvendig for å beskytte mot uspesifikk proteolyse under intracellulær transport. Et eksempel er hemagglutinin, som viser at når glykosylering hemmes av tunikamycin, blir den uglykosylerte formen raskt degradert av intracellulære proteaser [93]. Mekanismen om hvordan karbohydratdelen beskytter mot proteolyse er fremdeles ikke kjent. Likevel antas det at den tertiære strukturen av uglykosylert proteiner blir endret på en slik måte at nye protease-sensitive seter blir eksponert for proteolytisk spaltning og dermed proteindegradering. Dette viser at karbohydratdelen kan være viktig for å danne rett folding av nyproduserte polypeptider [93]. Det er også klart at "coating" med oligosakkarider på proteiner kan være med å beskytte polypeptidkjeden mot gjenkjennelse av proteaser eller antistoffer [86]. En annen viktig funksjon av oligosakkaridenheter på glykoproteiner er at de er involvert i oppstart av korrekt folding av polypeptider i rER, og etterfølgende opprettholdelse av oppløselighet og konformasjon. På en annen side finnes det flere eksempel på proteiner hvor hindring eller endring av glykosylering har liten åpenbar konsekvens for deres syntese, folding, eller levering til bestemmelsesstedet [86].

5.3 Effekten av tunikamycin på autoaktivering av prolegumain

Proteolytisk aktivering av lysosomale proteaser kan bli fremmet via autokatalytisk aktivering ved sur pH eller via andre proteaser [90]. Autoaktivering av prolegumain er tidligere studert [8, 11], og det viste seg at aktivering av prolegumain ble trigget av sur pH [8, 11, 91]. Tidligere ble det vist at når pH endres fra nøytral pH til pH 3,4-4,5 vil proformen (56 kDa) av legumain prosesseres, og den intermediære aktive formen (46 kDa) dannes [8]. Basert på tidligere studier [8, 43] ble pH 4,0 valgt for autoaktiveringseksperimenter.

Denne studien har vist at glykosylert prolegumain ble autoaktivert i både kondisjonert medium og lysatene fra DMSO-kontroll, og aktiviteten som ble vist antas å være grunnet prosessering av proformen (56 kDa) til den aktive, modne formen (36 kDa) i cellelysatenene, og den aktive, intermediære formen (46 kDa) i kondisjonerte medium. Uglykosylert prolegumain ble derimot autoaktivert i kondisjonert medium, men ikke i cellelysatenene.

Aktiviteten i kondisjonert medium kan være relatert til dannelse av den intermediære aktive formen, som vi antar er proteinbåndene på 31/32 kDa. Disse to formene kan representere ulik grad av glykosylering eller være forårsaket av alternativ proteolytisk spaltning. Likevel er disse formene kun observert veldig svakt uttrykt, og forsvant med økende inkuberingstid, noe som kan henge sammen med lav stabilitet. I cellelysaten ble et veldig svakt proteinbånd på 28 kDa observert og antas å være den aktive, fullt modne formen av legumain uten oligosakkarider, tilsvarende 36 kDa glykosylert legumain. Den ble kun observert etter 0 og 1,5 time. Dette kan forklare den lille økningen i legumainaktiviteten som ble observert ved samme tidspunkt.

Aktiviteten av den uglykosylerte legumain fra kondisjonerte medier som ble observert i en tidsperiode mellom 1 til 6 timer, antas å samsvare med at den intermediære formen kun ble observert i dette tidsrommet (immunoblott viser bare 1 og 6 timer, men det antas at denne formen også dannes ved 4 timer). Aktiviteten gikk ned etter 18 timer for uglykosylert legumain, men ikke for glykosylert legumain, sannsynligvis på grunn av lengre halveringstid og høyere stabilitet av legumain med oligosakkarider.

5.4 Effekt av tunikamycin på legumain sekresjon

Sekresjon av prolegumain er interessant, spesielt i kreftssammenheng. Legumain har blitt påvist ekstracellulært i surt svulst mikromiljø [67, 95, 96] hvor det muligens kan skje autoaktivering av ekstracellulært prolegumain (56 kDa) til den aktive, intermediære formen (46 kDa). Aktiv legumain kan dermed spalte sine ekstracellulære substrater, feks. proMMP-2 [71] og fibronektin [97], og dermed fremme invasjon og metastase i kreft [14].

Når celler dyrkes under tilstedeværelse av tunikamycin hemmes glykosylering av legumain, og cellene sekreterer uglykosylerte proteiner. Resultatene i denne studien viste at lav konsentrasjon (0,025 µg/ml) av tunikamycin stimulerte til økt sekresjon av prolegumain, mens høye konsentrasjoner (1 og 5 µg/ml) hadde en tendens til reduksjon av sekresjon av prolegumain. Det er grunn å tro at lave konsentrasjoner av tunikamycin kan påvirke proteinsyntesen i cellene i mindre grad enn høyere konsentrasjoner, og dermed føre til at mer uglykosylert prolegumain blir skilt ut i motsetning til ved høyere konsentrasjoner av tunikamycin. I en tidligere studie var 56 kDa proformen av legumain sekretert og detektert i det kondisjonerte mediet fra HCT116-celler [15]. I tillegg blir glykosylert prolegumain sekretert

fra makrofager [98], noe som kan forklare den overraskende observasjonen av legumain i humant serum fra brystkreftpasienter [68, 69]. I denne studien ble det vist at glykosylering spiller en viktig rolle for sekresjonen av legumain. En forklaring på dette kan være at prolegumain med oligosakkarid-delen får med seg et mannose-6-fosfat-motiv som gjør at prolegumain blir transportert gjennom Golgi-apparatet og videre til lysosomer, mens prolegumain uten oligosakkarider ikke får dette motivet og dermed blir sekret ut av cellen. Mannose-6-fosfat er viktig for transportveien til lysosomer [22], mens andre studier har vist at den likevel ikke er essensiell i bestemte celletyper i pattedyr [86].

Effekten av tunikamycin (0,5 µg/ml) er testet på sekresjon av IgM, IgA, og IgE [99]. Rollen til glykosylering i forbindelse med sekresjonen av immunoglobuliner varierte mellom ulike typene. Resultatene fra denne studien har vist at glykosylering er nødvendig for sekresjon av IgM og IgE, men ikke for IgG. I tillegg har det blitt postulert at glykosylering av immunoglobuliner kan påvirke konformasjonen. Dermed kan blokkering av glykosylering endre de fysiokjemiske egenskapene av disse proteinene [99]. Vår data viser at lav konsentrasjon av tunikamycin, som nevnt ovenfor, øker sekresjonen av prolegumain. Dette tyder på at oligosakkarid-delen er viktig for mekanismene bak sekresjon. Sekresjonen av prolegumain ble redusert ved høye konsentrasjoner av tunikamycin (1 og 5 µg/ml), men om dette er redusert fordi oligosakkarid-delen er viktig for sekresjonsveien er uklart. Et alternativ er at det er på grunn av hemmet proteinsyntese og økt proteolyse av uglykosylert form, som ble nevnt i forrige avsnitt. Det er mest sannsynlig at proteinsyntesen blir hemmet, siden lave konsentrasjoner av tunikamycin viste at prolegumain uten oligosakkarider ble skilt ut. Det kan se ut som glykosylering er viktig for sekresjon av legumain. Det betyr at prolegumain uten oligosakkarider og uten (mannose-6-fosfat) motiv blir skilt ut av cellene. Nylig ble også den aktive formen av legumain observert i cellekjernen [15], men om den uglykosylerte, aktive formen også finnes i cellekjernen er ukjent og krever videre studie.

Studier som har blitt gjort i vår forskningsgruppe har vist at både sekret glykosylert [14] og uglykosylert prolegumain (Ngoc N. Lunde, upubliserte data) blir tatt opp igjen i cellene. Om uglykosylert form blir glykosylert etter opptak er foreløpig uavklart.

Det har nylig blitt antatt at polyubiquitinerings av prolegumain kan fremme ekstracellulær sekresjon, og kan påvirke om legumain beholdes i cellene eller skilles ut til det

ekstracellulære miljøet [100]. Det virker sannsynlig at glykosylering og ubiquitinerings av legumain kan påvirke sekresjon gjennom forskjellige mekanismer.

5.5 Effekt av glukosaminoglykaner på autoaktivering av prolegumain

De naturlig forekommende negative ladede polysakkaridene, glykosaminoglykaner (GAGs) og det ikke-fysiologiske polysakkaridet, dektransulfat, har tidligere blitt vist å akselerere aktiviteten av flere cystein procathepsiner fra C1-familien [50, 53-55]. Et eksempel fra en nylig studie har vist at kondroitin-4-sulfat (C4S) kan fremme autoaktivering av cathepsin K via en kompleksdannelse [101]. I en annen studie ble det vist at GAGs også akselererer autoaktiveringen av prolegumain [43].

Resultatene våre har vist at kondroitin-4-sulfat (C4S) akselererer autoaktivering, mens heparansulfat (HS) ikke viste seg å akselerere autoaktivering av glykosylert prolegumain. HS ble funnet i en tidligere studie å akselerere autoaktivering av glykosylert prolegumain, men effekten av HS på prolegumain var lavere enn effekten til C4S [43]. En viktig forskjell er at den høyeste konsentrasjonen som ble brukt i vår studie er 100 µg/ml, mens det i den nevnte studien ble brukt en konsentrasjon på 200 µg/ml av HS. Siden effekten av HS ser ut til å være doseavhengig, kan det tenkes at det kreves høyere konsentrasjon av HS for å akselerere autoaktivering av glykosylert prolegumain enn det som ble brukt i denne oppgaven. I motsetning til dette er lavere konsentrasjoner enn 200 µg/ml av C4S tilstrekkelig for å akselerere autoaktivering av glykosylert prolegumain. Tiden som ble valgt for inkubering av prolegumain med GAGs var basert på studien som ble utført av Berven *et al.* (2013) [43]. Resultatene fra denne studien viste at maksimal aktivitet var oppnådd etter 2-4 timers inkubering med GAGs. Derfor ble tiden 4 timer valgt. Videre det er vist at GAGs ikke hadde påvirkning på aktiviteten av den aktive formen av legumain [43]. Aktiviteten som ble observert etter legumainaktivitetsmåling kan forklare dannelsen av den aktive intermediære formen av legumain (46 kDa). Etter tilsetning av C4S så det ut til å være mer av denne formen (46 kDa) i forhold til proformen, og proformen forsvant ved høye konsentrasjoner (25 og 100 µg/ml). Det kan forklares ved at det har skjedd en fullstendig prosessering ved høy konsentrasjon av C4S (25 og 100 µg/ml) sammenlignet med lavere konsentrasjon av C4S (5 µg/ml) hvor proformen fortsatt var observert. Noe som kan forklares ved at det har skjedd en

delvis omdannelse til den aktive, intermediære formen. I motsetning til C4S vises det kun delvis prosessering fra proformen (56 kDa) til den aktive, intermediære formen (46 kDa) ved tilstedeværelse av HS. I tillegg ble det observert mer proform ved HS sammenlignet med C4S. I studien som ble utført av Berven *et al.* (2013) ble det dannet mer av den aktive intermediære formen (46 kDa) enn det som ble observert i denne oppgaven, og etter 6 timer forsvant proformen (56 kDa) [43]. Dette kan vise at høyre konsentrasjon enn 100 µg/ml av HS kan være nødvendig for å kunne akselerere autoaktivering av prolegumain fullstendig. I tillegg kan det være nødvendig for HS å bli inkubert i mer enn 4 timer dersom lavere konsentrasjon enn 200 µg/ml benyttes.

Forskjellen i effekten mellom HS og C4S, kan forklares med at HS er vist å være mindre potent enn C4S [43]. I tillegg har det blitt vist at interaksjonen mellom GAGs og legumain er avhengig av nivået av GAG-sulfatering [43]. Forskjellen kan derfor trolig skyldes ulik grad av sulfatering på HS og C4S. Likevel antas det at graden av sulfatering ikke er den eneste faktoren som regulerer autoaktiveringen av prolegumain. Forskjellen i oppbygning av strukturen mellom disse GAGs kan i stedet forklare effektforskjellen. C4S er sammensatt av repeterende GlcA-GalNAc-enheter, mens HS er en polymer av GlcA/IdoA-GlcNAc [43].

Videre ble GAGs sin effekt på autoaktivering av uglykosylert prolegumain undersøkt. Resultatene viste at det ikke har skjedd autoaktivering av den uglykosylerte prolegumain. Derimot så det ut som aktiviteten av uglykosylert legumain ble redusert ved tilstedeværelse av GAGs (C4S og HS). Dette er interessant siden resultatene fra autoaktivert medium uten GAGs til stede (tidligere avsnitt) har vist at prolegumain ble autoaktivert i kondisjonerte medium fra tunikamycinbehandlede M38L-celler.

Grunnen til at aktiviteten av uglykosylert legumain ble redusert ved tilstedeværelse av GAGs kan være at oligosakkarid-delen er viktig for interaksjonen med GAGs, og uten disse gruppene oppstår det ingen interaksjon mellom legumain og GAGs og dermed vil ikke autoaktiveringen akselereres. En annen forklaring kan være at GAGs sterisk hindrer aktivering av uglykosylert legumain. Det er vist i nylige studier at autoproteolytisk prosessering må følges av en konformasjonsendring for full aktivering [102]. Dermed kan det være at GAGs sterisk hindrer konformasjonsendring og aktivering av prolegumain til den aktive, intermediære formen, men mekanismen for dette er uklart. Mangelen på observert legumainaktivitet kan bekrefte det som ble observert fra immunoblott, nemlig at proform ble

ikke prosessert til den aktive formen av legumain. Videre ble det observert svake proteinbånd (31/32 kDa) fra autoaktivert prolegumain i DMSO-kontroll for HS, og disse båndene er antatt å være den uglykosylerte, aktive, intermediære formen av legumain (samsvar med tidligere observerte resultater ovenfor), og dette kan forklare den lave aktiviteten. Tilsvarende proteinbånd ble ikke observert i DMSO-kontroll for C4S, selv om det var forventet at disse proteinbåndene skal være der siden det er samme DMSO-kontroll for begge GAGs. Disse proteinbåndene ble observert med veldig svak intensitet, noe som igjen kan være relatert til stabiliteten, nevnt i tidligere avsnitt.

Autoaktivering av prolegumain har også vist seg å bli akselerert av alginater på en konsentrasjons-, tids- og pH-avhengig måte [103]. Om alginater kan akselerere autoaktivering av uglykosylerte prolegumain er ikke studert, men både alginater og GAGs akselererte autoaktivering av prolegumain på lignende måte. Dermed forventes det ikke at alginater kan akselerere autoaktivering av uglykosylerte prolegumain. Likevel bør dette studeres ytterlig før man kan trekke en konklusjon.

6 Konklusjon

Hovedfunnene i denne masteroppgaven er at:

- 1) Tunikamycin hemmer glykosylering slik at det dannes uglykosylerte varianter av både proform og aktiv form av legumain
- 2) Den uglykosylerte modne aktive legumainformen (28 kDa) ble observert i M38L-celler, men ikke i HCT116-celler
- 3) Lav konsentrasjon (0,025 µg/ml) av tunikamycin økte signifikant sekresjonen av prolegumain, mens høy konsentrasjon (5 µg/ml) hadde tendens til å redusere sekresjon av prolegumain
- 4) Glykosylering er viktig for autoaktivering, aktivitet og stabilitet av legumain
- 5) C4S akselererer autoaktivering av glykosylert prolegumain
- 6) GAGs (C4S og HS) akselerer ikke autoaktiveringen av uglykosylert prolegumain
- 7) GAGs akselererende effekt på autoaktiveringen av glykosylert, men ikke uglykosylert prolegumain indikerer at oligosakkarid-delen spiller en viktig rolle i interaksjonen mellom GAGs og prolegumain
- 8) GAGs effekt på autoaktivering av prolegumain ser ut å være konsentrasjonsavhengig

7 Framtidige perspektiver

På grunn av den begrensede tidsperiode av dette prosjektet, gjenstår flere spørsmål ubesvart og videre utredning og validering er nødvendig.

Nedenfor er forslag over undersøkelser som må repeteres eller som kan være interessante i fremtidige studier:

- Hva skyldes at det ble dannet uglykosylert aktiv legumain (28 kDa) fra tunikamycinbehandlede M38L-celler og ikke-HCT116-celler?
- Hvorfor førte lav konsentrasjon av tunikamycin (0,025 µg/ml) til økt legumainsekresjon i HCT116-celler?
- Vil lav konsentrasjon (0,025 µg/ml) også stimulere legumain sekresjon fra M38L-celler?
- Høye tunikamycinkonsentrasjoner (1 og 5 µg/ml) hadde tendens til å redusere sekresjonen fra cellene, men det ble testet få ganger, og bør dermed testes mer for å bekrefte dette
- Hvorfor kunne uglykosylert prolegumain bli autoaktivert i kondisjonert cellemedium?
- Kan uglykosylerte prolegumain finnes i og være aktiv i cellekjernen?
- GAGs akselererte ikke autoaktivering av uglykosylert prolegumain, men flere tester er nødvendig for å bekrefte dette
- Autoaktivering av cellelysater ble utført få ganger, og det kan være interessant å undersøke dette mer, og å teste GAGs på autoaktivering av prolegumain i cellelysater
- Det kan være interessant å undersøke om GAGs har effekt på autoaktivering av uglykosylert prolegumain ved andre pH enn pH 4.0
- Er den observerte effekten av GAGs på autoaktivering av glykosylert og uglykosylert prolegumain generell?
- Vil sekrent uglykosylert prolegumain bli tatt opp (internalisert) av celler på lignende måte som tidligere er vist for glykosylert prolegumain [14] og vil det skje en intracellulær prosessering? Det kan i slike forsøk være nyttig å bruke fluorescensmikroskopi for å studere lokalisering av den uglykosylerte legumain
- Det kan også være interessant å deglykosylere prolegumain og undersøke autoaktivering ved tilstedeværelse av GAGs, samt å sammenligne autoaktivering av glykosylert, deglykosylert og uglykosylert prolegumain med og uten GAGs til stede.

Litteraturliste

1. Turk, B., *Targeting proteases: successes, failures and future prospects*. Nature reviews. Drug discovery, 2006. **5**(9): p. 785-99.
2. Puente, X., et al., *Human and mouse proteases: a comparative genomic approach*. Nature reviews. Genetics, 2003. **4**(7): p. 544-58.
3. Rawlings, N., A. Barrett, and A. Bateman, *MEROPS: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors*. Nucleic acids research, 2012. **40**(Database issue): p. D343-50.
4. Rawlings, N., et al., *MEROPS: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors*. Nucleic acids research, 2014. **42**(Database issue): p. D503-9.
5. Turk, B., D. Turk, and V. Turk, *Protease signalling: the cutting edge*. EMBO journal, 2012. **31**(7): p. 1630-43.
6. Chwieralski, C.E., T. Welte, and F. Bühling, *Cathepsin-regulated apoptosis*. Apoptosis, 2006. **11**(2): p. 143-9.
7. Chen, J.M., et al., *Cloning, isolation, and characterization of mammalian legumain, an asparaginyl endopeptidase*. Journal of biological chemistry, 1997. **272**(12): p. 8090-8.
8. Li, D., et al., *Multistep autoactivation of asparaginyl endopeptidase in vitro and in vivo*. Journal of biological chemistry, 2003. **278**(40): p. 38980-90.
9. Chen, J.M., et al., *Identification of the active site of legumain links it to caspases, clostripain and gingipains in a new clan of cysteine endopeptidases*. FEBS letters, 1998. **441**(3): p. 361-5.
10. Mathieu, M., et al., *Substrate specificity of schistosome versus human legumain determined by P1-P3 peptide libraries*. Molecular and biochemical parasitology, 2002. **121**(1): p. 99-105.
11. Halfon, S., et al., *Autocatalytic activation of human legumain at aspartic acid residues*. FEBS letters, 1998. **438**(1-2): p. 114-8.
12. Shirahama Noda, K., et al., *Biosynthetic processing of cathepsins and lysosomal degradation are abolished in asparaginyl endopeptidase-deficient mice*. Journal of biological chemistry, 2003. **278**(35): p. 33194-9.

13. Alvarez Fernandez, M., et al., *Inhibition of mammalian legumain by some cystatins is due to a novel second reactive site*. Journal of biological chemistry, 1999. **274**(27): p. 19195-203.
14. Smith, R., et al., *Intra- and extracellular regulation of activity and processing of legumain by cystatin E/M*. Biochimie, 2012. **94**(12): p. 2590-9.
15. Haugen, M., et al., *Nuclear legumain activity in colorectal cancer*. PLoS ONE, 2013. **8**(1): p. e52980.
16. Haugen, M., et al., *High expression of the cysteine proteinase legumain in colorectal cancer - Implications for therapeutic targeting*. European journal of cancer, 2015. **51**(1): p. 9-17.
17. Dall, E. and H. Brandstetter, *Mechanistic and structural studies on legumain explain its zymogenicity, distinct activation pathways, and regulation*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2013. **110**(27): p. 10940-5.
18. Zhao, L., et al., *Structural analysis of asparaginyl endopeptidase reveals the activation mechanism and a reversible intermediate maturation stage*. Cell Research, 2014. **24**(3): p. 344-58.
19. Albert, B., et al., *Intracellular compartments and protein sorting in Molecular biology of the cell, 5th*. 2008, Garland Science: New York. p. 724-739.
20. Walter, P. and A.E. Johnson, *Signal sequence recognition and protein targeting to the endoplasmic reticulum membrane*. Annu Rev Cell Biol, 1994. **10**: p. 87-119.
21. Brix, K., et al., *Proteolysis mediated by cysteine cathepsins and legumain-recent advances and cell biological challenges*. Protoplasma, 2014.
22. Shandala, T., E.J. Parkinson-Lawrence, and D.A. Brooks, *Protein: Cotranslational and Posttranslational Modification in Organelles*, in *eLS*. 2001, John Wiley & Sons, Ltd.
23. Albert, B., et al., *Intracellular Compartments and Transport in Essential cell biology, 3rd ed.* . 2010, Garland Science: New york and London. p. 514-527.
24. Smith, R., *Subcellular localization of legumain and cystein E/M*, in *Regulation of legumain in human cells* 2014, University of Oslo: Norway. p. 28-29.
25. Zafar, S., A. Nasir, and H. Bokhari, *Computational analysis reveals abundance of potential glycoproteins in Archaea, Bacteria and Eukarya*. Bioinformation, 2011. **6**(9): p. 352-5.

26. Farley, A.R. and A.J. Link, *Chapter 40 Identification and Quantification of Protein Posttranslational Modifications*, in *Methods in Enzymology*, R.B. Richard and P.D. Murray, Editors. 2009, Academic Press. p. 725-763.
27. Helenius, A. and M. Aeby, *Intracellular functions of N-linked glycans*. *Science*, 2001. **291**(5512): p. 2364-9.
28. Pless, D.D. and W.J. Lennarz, *Enzymatic conversion of proteins to glycoproteins*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1977. **74**(1): p. 134-8.
29. Breitling, J. and M. Aeby, *N-linked protein glycosylation in the endoplasmic reticulum*. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2013. **5**(8): p. a013359.
30. Kornfeld, R. and S. Kornfeld, *Assembly of asparagine-linked oligosaccharides*. *Annu Rev Biochem*, 1985. **54**: p. 631-64.
31. Rudd, P.M. and R.A. Dwek, *Glycosylation: heterogeneity and the 3D structure of proteins*. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 1997. **32**(1): p. 1-100.
32. Damgaard, I., *N-linked glycosylation and phosphorylation; what determines legumain localization and activation?*. Master thesis, 2014, School of Pharmacy, University of Oslo: Oslo, Norway
33. Kuhn, P., et al., *Crystallization and preliminary crystallographic analysis of peptide-N4-(N-acetyl-beta-D-glucosaminyl)asparagine amidase PNGase F*. *Journal of Molecular Biology*, 1994. **241**(4): p. 622-3.
34. O'Neill, R.A., *Enzymatic release of oligosaccharides from glycoproteins for chromatographic and electrophoretic analysis*. *Journal of chromatography A*, 1996. **720**(1-2): p. 201-15.
35. Elbein, A.D., *Inhibitors of the biosynthesis and processing of N-linked oligosaccharide chains*. *Annu Rev Biochem*, 1987. **56**: p. 497-534.
36. Takatsuki, A., K. Arima, and G. Tamura, *Tunicamycin, a new antibiotic. I. Isolation and characterization of tunicamycin*. *J Antibiot (Tokyo)*, 1971. **24**(4): p. 215-23.
37. Heifetz, A., et al., *Mechanism of action of tunicamycin on the UDP-GlcNAc:dolichyl-phosphate GlcNAc-1-phosphate transferase*. *Biochemistry*, 1979. **18**(11): p. 2186-2192.
38. Lehle, L. and W. Tanner, *The specific site of tunicamycin inhibition in the formation of dolichol-bound N-acetylglucosamine derivatives*. *FEBS Letters*, 1976. **71**(1): p. 167-170.

39. Tkacz, J.S. and O. Lampen, *Tunicamycin inhibition of polyisoprenyl N-acetylglucosaminyl pyrophosphate formation in calf-liver microsomes*. Biochemical and biophysical research communications, 1975. **65**(1): p. 248-57.
40. Powell, L.D., *Inhibition of N-linked glycosylation*. Curr Protoc Immunol, 2001. **Chapter 8**: p. Unit 8.14.
41. Savage, K.E. and P.S. Baur, *Effect of tunicamycin, an inhibitor of protein glycosylation, on division of tumour cells in vitro*. J Cell Sci, 1983. **64**: p. 295-306.
42. Kjellén L1, L.U., *Proteoglycans: structures and interactions*. Annu Rev Biochem. , 1991;60:443-75.
43. Berven, L., et al., *Autoactivation of prolegumain is accelerated by glycosaminoglycans*. Biochimie, 2013. **95**(4): p. 772-81.
44. Kjellen, L. and U. Lindahl, *Proteoglycans: structures and interactions*. Annu Rev Biochem, 1991. **60**: p. 443-75.
45. Prydz, K. and K.T. Dalen, *Synthesis and sorting of proteoglycans*. J Cell Sci, 2000. **113 Pt 2**: p. 193-205.
46. Kolset, S., K. Prydz, and G. Pejler, *Intracellular proteoglycans*. Biochemical journal, 2004. **379**(2): p. 217-27.
47. Gallagher, J.T., *Structure and function of heparan sulphate proteoglycans*. Biochemical journal, 1986. **236**(2): p. 313-325.
48. Gallagher, J.T., *Molecular distinctions between heparan sulphate and heparin. Analysis of sulphation patterns indicates that heparan sulphate and heparin are separate families of N-sulphated polysaccharides*. Biochemical journal, 1985. **230**(3): p. 665-674.
49. Rozman, J., et al., *Autocatalytic processing of recombinant human procathepsin B is a bimolecular process*. FEBS Letters, 1999. **459**(3): p. 358-362.
50. Caglić, D., et al., *Glycosaminoglycans facilitate procathepsin B activation through disruption of propeptide-mature enzyme interactions*. Journal of Biological Chemistry, 2007. **282**(45): p. 33076-33085.
51. Mach, L., J.S. Mort, and J. Glossl, *Maturation of human procathepsin B. Proenzyme activation and proteolytic processing of the precursor to the mature proteinase, in vitro, are primarily unimolecular processes*. Journal of Biological Chemistry, 1994. **269**(17): p. 13030-13035.

52. Beckman, M., et al., *Activation of cathepsin D by glycosaminoglycans*. FEBS Journal, 2009. **276**(24): p. 7343-7352.
53. Vasiljeva, O., et al., *Recombinant Human Cathepsin H Lacking the Mini Chain Is an Endopeptidase*. Biochemistry, 2003. **42**(46): p. 13522-13528.
54. Ishidoh, K. and E. Kominami, *Procathepsin L degrades extracellular matrix proteins in the presence of glycosaminoglycans in vitro*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1995. **217**(2): p. 624-631.
55. Fairhead, M., S.M. Kelly, and C.F. van der Walle, *A heparin binding motif on the pro-domain of human procathepsin L mediates zymogen destabilization and activation*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2008. **366**(3): p. 862-867.
56. Mason, R.W. and S.D. Massey, *Surface activation of pro-cathepsin L*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1992. **189**(3): p. 1659-1666.
57. Vasiljeva, O., et al., *Recombinant human procathepsin S is capable of autocatalytic processing at neutral pH in the presence of glycosaminoglycans*. FEBS Letters, 2005. **579**(5): p. 1285-1290.
58. Li, Z., et al., *Collagenase activity of cathepsin K depends on complex formation with chondroitin sulfate*. Journal of Biological Chemistry, 2002. **277**(32): p. 28669-28676.
59. Kubota, K., K. Wakabayashi, and T. Matsuoka, *Proteome analysis of secreted proteins during osteoclast differentiation using two different methods: Two-dimensional electrophoresis and isotope-coded affinity tags analysis with two-dimensional chromatography*. Proteomics, 2003. **3**(5): p. 616-626.
60. Murthy, R., et al., *Legumain expression in relation to clinicopathologic and biological variables in colorectal cancer*. Clinical cancer research, 2005. **11**(6): p. 2293-9.
61. Norsk-Elektronisk- Legehandboka. Kreft.2009. [cited 2015 21.01]; Available from: <http://legehandboka.no/kreft/pasientinformasjon/om-kreft/kreft-1808.html>
62. Hanahan, D. and Robert A. Weinberg, *Hallmarks of Cancer: The Next Generation*. Cell, 2011. **144**(5): p. 646-674.
63. Wan, L., K. Pantel, and Y. Kang, *Tumor metastasis: moving new biological insights into the clinic*. Nature medicine, 2013. **19**(11): p. 1450-64.
64. Talmadge, J. and I. Fidler, *AACR centennial series: the biology of cancer metastasis: historical perspective*. Cancer research, 2010. **70**(14): p. 5649-69.

65. Valastyan, S. and R. Weinberg, *Tumor metastasis: molecular insights and evolving paradigms*. Cell, 2011. **147**(2): p. 275-92.
66. Poste, G. and I.J. Fidler, *The pathogenesis of cancer metastasis*. Nature, 1979. **283**: p. 139-146.
67. Liu, C., et al., *Overexpression of legumain in tumors is significant for invasion/metastasis and a candidate enzymatic target for prodrug therapy*. Cancer research, 2003. **63**(11): p. 2957-64.
68. Gawenda, J., et al., *Legumain expression as a prognostic factor in breast cancer patients*. Breast Cancer Research and Treatment, 2007. **102**(1): p. 1-6.
69. Wu, M., et al., *Legumain protein as a potential predictive biomarker for Asian patients with breast carcinoma*. Asian Pacific journal of cancer prevention, 2014. **15**(24): p. 10773-7.
70. Ohno, Y., et al., *Association of legumain expression pattern with prostate cancer invasiveness and aggressiveness*. World Journal of Urology, 2013. **31**(2): p. 359-64.
71. Chen, J.M., et al., *Activation of progelatinase A by mammalian legumain, a recently discovered cysteine proteinase*. Biological Chemistry, 2001. **382**(5): p. 777-83.
72. Yamane, T., et al., *Transcriptional regulation of the legumain gene by p53 in HCT116 cells*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2013. **438**(4): p. 613-618.
73. Mahato, R., W. Tai, and K. Cheng, *Prodrugs for improving tumor targetability and efficiency*. Advanced drug delivery reviews, 2011. **63**(8): p. 659-70.
74. Ueki, N., et al., *Selective cancer targeting with prodrugs activated by histone deacetylases and a tumour-associated protease*. Nat Commun, 2013. **4**: p. 2735.
75. Katz, J., J. Janik, and A. Younes, *Brentuximab Vedotin (SGN-35)*. Clinical cancer research, 2011. **17**(20): p. 6428-36.
76. Stern, L., et al., *A novel antitumor prodrug platform designed to be cleaved by the endoprotease legumain*. Bioconjugate chemistry, 2009. **20**(3): p. 500-10.
77. Bajjuri, K., et al., *The legumain protease-activated auristatin prodrugs suppress tumor growth and metastasis without toxicity*. ChemMedChem, 2011. **6**(1): p. 54-9.
78. Smith, R.L., et al., *Synthesis of a novel legumain-cleavable colchicine prodrug with cell-specific toxicity*. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2014. **22**(13): p. 3309-3315.
79. Choi, K., et al., *Protease-activated drug development*. Theranostics, 2012. **2**(2): p. 156-78.

80. Solberg, S. and O. Laerum, [*Cryobiology-- freeze preservation and storage of living cells and tissues*]. Tidsskrift for den norske legeforening, 2004. **124**(20): p. 2607-9.
81. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Analytical Biochemistry, 1976. **72**(1-2): p. 248-254.
82. Johansen, H.T., C.G. Knight, and A.J. Barrett, *Colorimetric and fluorimetric microplate assays for legumain and a staining reaction for detection of the enzyme after electrophoresis*. Analytical biochemistry, 1999. **273**(2): p. 278-83.
83. Brunelle, J.L. and R. Green, *Chapter Twelve - One-dimensional SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (1D SDS-PAGE)*, in *Methods in Enzymology*, L. Jon, Editor. 2014, Academic Press. p. 151-159.
84. Weng, W., et al., *Molecular therapy of colorectal cancer: Progress and future directions*. International journal of cancer, 2014. **136**(3): p. 493-502.
85. Thomas, P. and T. Smart, *HEK293 cell line: a vehicle for the expression of recombinant proteins*. Journal of pharmacological and toxicological methods, 2005. **51**(3): p. 187-200.
86. Varki, A., *Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct*. Glycobiology, 1993. **3**(2): p. 97-130.
87. Copeland, C.S., et al., *Assembly of influenza hemagglutinin trimers and its role in intracellular transport*. The Journal of cell biology, 1986. **103**(4): p. 1179-91.
88. Gallagher, P.J., et al., *Glycosylation requirements for intracellular transport and function of the hemagglutinin of influenza virus*. Journal of virology, 1992. **66**(12): p. 7136-45.
89. Olden, K., R.M. Pratt, and K.M. Yamada, *Role of carbohydrate in biological function of the adhesive glycoprotein fibronectin*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1979. **76**(7): p. 3343-7.
90. Ishidoh, K. and E. Kominami, *Processing and activation of lysosomal proteinases*. Biological Chemistry, 2002. **383**(12): p. 1827-31.
91. Chen, J.M., M. Fortunato, and A.J. Barrett, *Activation of human prolegumain by cleavage at a C-terminal asparagine residue*. Biochem J, 2000. **352 Pt 2**: p. 327-34.
92. Lecaille, F., et al., *Proteinases participating in the processing and activation of prolegumain in primary cultured rat macrophages*. Biological Chemistry, 2004. **385**(6): p. 511-6.

93. Olden, K., J.B. Parent, and S.L. White, *Carbohydrate moieties of glycoproteins. A re-evaluation of their function.* Biochimica et biophysica acta, 1982. **650**(4): p. 209-32.
94. Trowbridge, I.S., R. Hyman, and C. Mazauskas, *The synthesis and properties of T25 blycoprotein in Thy-1-negative mutant lymphoma cells.* Cell, 1978. **14**(1): p. 21-32.
95. Wu, W., et al., *Targeting cell-impermeable prodrug activation to tumor microenvironment eradicates multiple drug-resistant neoplasms.* Cancer research, 2006. **66**(2): p. 970-80.
96. Liu, Y., et al., *Targeting cell surface alpha(v)beta(3) integrin increases therapeutic efficacies of a legumain protease-activated auristatin prodrug.* Molecular pharmaceutics, 2012. **9**(1): p. 168-75.
97. Morita, Y., et al., *Legumain/asparaginyl endopeptidase controls extracellular matrix remodeling through the degradation of fibronectin in mouse renal proximal tubular cells.* FEBS letters, 2007. **581**(7): p. 1417-24.
98. Solberg, R., et al., *Legumain expression, activity and secretion are increased during monocyte-to-macrophage differentiation and inhibited by atorvastatin.* Biological Chemistry, 2015. **396**(1): p. 71-80.
99. Kornfeld, S.H.a.S., *Effect of Tunicamycin on IgM, IgA, and IgG Secretion by Mouse Plasmacytoma Cells.* The Journal of Immunology, 1978. **121**: p. 990-996.
100. Lin, Y., et al., *Functional role of asparaginyl endopeptidase ubiquitination by TRAF6 in tumor invasion and metastasis.* Journal of the National Cancer Institute, 2014. **106**(4): p. dju012.
101. Lemaire, P., et al., *Chondroitin sulfate promotes activation of cathepsin K.* Journal of biological chemistry, 2014. **289**(31): p. 21562-72.
102. Dall, E. and H. Brandstetter, *Activation of legumain involves proteolytic and conformational events, resulting in a context- and substrate-dependent activity profile.* Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications, 2012. **68**(1): p. 24-31.
103. Berven, L., et al., *Alginates induce legumain activity in RAW 264.7 cells and accelerate autoactivation of prolegumain.* Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre, 2013. **2**(1): p. 30-44.

Vedlegg

1. Celledyrkning og høsting

Dyrkningsmedium for M38L- og HCT116-celler

1.1 Serumholdig DMEM-medium:

440 ml DMEM med 4 mM L-glutamin, 4500 mg/L glukose

50 ml Føtalt kalveserum (FBS)

5 ml Natriumpyrovat 100 mM

5 ml penicillin (10 000 U/ml) – streptomycin (100 µg/ml)

1.2 Serumfritt DMEM-medium:

440 ml DMEM med 4 mM L-glutamin, 4500 mg/L glukose

5 ml Natriumpyrovat 100mM løsning

5 ml penicillin (10000 U/ml) – streptomycin (100 µg/ml)

1.3 1 X PBS

0,2 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$

1 g $\text{Na}_2\text{H}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

6 g $\text{Na}_3 \text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

8 g NaCl

dH₂O til **1,0 L**

1.4 Lysisbuffer (pH 5,8)

14,71 g Natriumcitrat ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)

0,19 g Na₂- EDTA ($\text{Na}_2\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_8$)

5 g N-oktyl-β-D-glukopyranosid

pH justert med HCl til 5,8

dH₂O til **500 ml**

2 Totalproteinmåling

Fortynnet Coomassierreagens 1:5

10 ml Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate

dH₂O til **40 ml**

3 Enzymaktivitet av legumain

3.1 Legumain-assaybuffer (pH 5,8)

8,3005 g Sitronsyre (C₆H₈O₇·xH₂O)

21,537 g Na₂HPO₄·2H₂O

0,37224 g Na₂EDTA (Na₂C₁₀H₁₆N₂O₈)

0,1 g CHAPS

dH₂O til **1,0 L**

200 µL 200 mM ditiotreitol (DTT) tilsettes 40 ml assaybuffer rett før bruk

3.2 Legumain-substratoppløsning (34 µM)

200 µl av stock-løsning-Ala-Ala-Asn-AMC (2,5 mM i DMSO)

14,5 ml Legumain assaybuffer (pH 5,8)

4 Autoaktivering av legumain

4.1 Autoaktiveringsbuffer (pH 4,0)

0,74 g Na₂EDTA (Na₂C₁₀H₁₆N₂O₈)

5,75 ml konsentrert eddiksyre (CH₃COOH)

dH₂O til **500 ml**

pH justert med NaOH til 4,0

5 Immunoblotting

5.1 Elektroforesebuffer

Fortynnet 1:20

40 ml NuPAGE ® MOPS SDS Running Buffer (20 X)

dH₂O til **800 ml**

500 µl NuPAGE ® Antioksidant direkte i blotterbuffer i elektroforesekaret

5.2 Blottebuffer

400 ml 10 X Tris/Glycine-buffer (Bio-Rad)

800 ml Metanol (MeOH),

dH₂O til **2,8 L**

5.3 Blotto 5 % (100 ml) (oppbevares i kjøleskap)

Trenger omtrent 50 ml til hver membran.

5 g fettfri tørrmelk

1 X T-TBS tilsettes til **100 ml**

5.4 10 x T-TBS oppskrift

48,4 g Tris

220,2 g NaCl

Tween 20 (20 ml)

pH justert med HCl til 7,5

dH₂O til 2000 ml

Fortynnes 1:10 før bruk

5.5 Elektroforeseprøve

Elektroforeseprøve ble laget ved å blande:

X µl prøve fra forsøk + X µl lysisbuffer/vann = 13 µl totalvolum

5 µl av 4 x Sample Buffer

2 µl av 0,5 M DTT

= 20 µl totalvolum

Prøven varmes opp i 10 minutter ved 70 °C